

Masteroppgave i farmakognosi

***Solidago canadensis* – en medisinsplante med antioksidanteffekt**

Del I



Thi Thanh Phan

Avdeling for farmasøytisk kjemi, Seksjon for farmakognosi,

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2008

Masteroppgave i farmakognosi

***Solidago canadensis* – en medisinsplante med antioksidanteffekt**

Del I



Thi Thanh Phan

Utført ved

Avdeling for farmasøytisk kjemi, Seksjon for farmakognosi,

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2008

Veiledere

Professor Karl Egil Malterud

Post doc. Helle Wangenstein

Forord

Mine fem år som student ved Farmasøytisk institutt avsluttes med denne masteroppgaven. Tiden har gått utrolig fort, spesielt det siste året som var preget av mye arbeid og utfordringer, men også mye moro.

Dette heftet utgjør del I av masteroppgaven. Det inneholder selve avhandlingen, mens del II inneholder vedleggene til del I av oppgaven.

Først vil jeg gjerne rette en spesiell stor takk til professor Karl Egil Malterud og post. doc Helle Wangenstein for særdeles god veiledning og for all den inspirasjon og hjelp dere har gitt meg under arbeidet. Gjennom engasjert og alltid velvillig veiledning har dere bidratt til å gjøre dette til et spennende og lærerikt år. I tillegg er jeg meget takknemlig for at professor Karl Egil Malterud har ledet meg inn på dette interessante felt.

Jeg vil også gjerne få takke Trine Grønhaug Halvorsen ved Farmasøytisk Institutt for gjennomføring av LC-MS-analysene, og Frode Rise på Kjemisk Institutt for gjennomføring av 2-dimensjonal NMR spektroskopi.

Ellers vil jeg takke Bente Rasch for bestilling av artikler og bøker, doktorstipendiat Adiaratou Togola for oversettelse av franske artikler og hyggelige stunder på kontoret, Adam Babinski og Tom Erik Grønhaug for IT-hjelp, Ellen Cohen for bestilling av kjemikalier og laboratoriumsutstyr, Ingvild Austarheim for oppmuntrende klemmer og råd. Alle ansatte og andre masterstudenter ved avdeling for Farmakognosi for en trivelig tid i et inspirerende miljø.

En hjertelig takk til min familie og mine nærmeste venner for forståelse, oppmuntring og god støtte gjennom hele studietiden. Takk til anh Minh for god støtte og oppmuntring.

Til slutt vil jeg takke Gud for å ha gitt meg mange nådegaver, styrker og velsignelser.

Oslo, 15.mai 2008

Thi Thanh Phan

Innhold

1	Sammendrag	1
2	Forkortelser	3
3	Hensikt med oppgaven	4
4	Bakgrunn	5
4.1	<i>Solidago canadensis</i>	5
4.1.1	Systematikk	5
4.1.2	Historikk	5
4.1.3	Botaniske forhold	6
4.1.4	Habitat	8
4.1.5	Reproduksjon og miljøproblem	8
4.1.6	Tradisjonell bruk	9
4.1.7	Tidligere funn	10
4.2	Antioksidanter og frie radikaler	16
4.2.1	Antioksidanter	16
4.2.2	Frie radikaler og reaktive oksygen species	17
4.2.3	Dannelse av frie radikaler og ROS	17
4.2.4	Antioksidantforsvar	19
4.2.5	Oksidativt stress	21
4.2.6	Lipidperoksidering	21
4.2.7	Patologisk betydning	23
4.3	Arakidonsyremetabolisme og 15-lipoksygenase	24
4.4	Generelt om isolerte substanser	27
4.4.1	Flavonoider	27
4.4.2	Labdan-type diterpen	28
5	Eksperimentelt	30
5.1	Materialer	30
5.1.1	Kjemikalier	30
5.1.2	Apparatur	31
5.2	Metoder	33
5.2.1	Generelle metoder	33
5.2.2	Separasjonsmetoder	33
5.2.3	Identifikasjonsmetoder	39
5.2.4	Metoder for måling av biologisk aktivitet	50
5.3	Praktisk utførelse	55
5.3.1	Plantemateriale	55

5.3.2	Ekstraksjon av plantemateriale.....	55
5.3.3	Ekstraksjon av råekstrakt	57
5.3.4	Blad etylacetat ekstrakt	60
5.3.5	Rot organisk ekstrakt.....	65
6	Resultat og diskusjon	78
6.1	Ekstraksjon av plantemateriale	78
6.1.1	Utbytte av råekstrakt	78
6.1.2	NMR-spektroskopi	79
6.1.3	Bioassay	80
6.2	Ekstraksjon av råekstrakt.....	83
6.2.1	NMR-spektroskopi	83
6.2.2	Utbytte av ekstrakter og bioassay.....	85
6.3	Blad etylacetat ekstrakt.....	87
6.3.1	Fraksjonering av blad etylacetat ekstrakt	87
6.3.2	Fraksjonering av BE1	91
6.3.3	Fraksjonering av BE1.1	95
6.3.4	Fraksjonering av BE1.2.....	96
6.3.5	Isolerte krystallinske forbindelser fra BE.....	97
6.3.6	Bioassay	100
6.4	Rot organisk ekstrakt	102
6.4.1	Fraksjonering av rot organisk ekstrakt	102
6.4.2	Fraksjonering av RO7	105
6.4.3	Videre separasjon av RO7.4.....	105
6.4.4	Videre separasjon av RO7.5.....	107
6.4.5	Fraksjonering av RO10	109
6.4.6	Videre separasjon av RO10.1	109
6.4.7	Videre separasjon av RO10.2.....	109
6.4.8	Videre separasjon av RO10.2.2.....	110
6.4.9	Fraksjonering av RO11	111
6.4.10	Isolerte forbindelser fra RO.....	112
7	Konklusjon	122
7.1	Forslag for videre arbeid.....	123
8	Referanseliste	124

1 **Sammendrag**

Planten *Solidago canadensis* (*S. canadensis*) har sin opprinnelse fra Nord-Amerika, og er en farlig ekspansiv art som kan utkonkurrere naturlig vegetasjon. Selv om planten kan true miljøet rundt seg, har denne oppgaven og andre studier vist at den inneholder mange bioaktive forbindelser som er av stor interesse for oss mennesker.

Drogene blad, blomst og stengel til *S. canadensis* ble ekstrahert med 80 % etanol. Disse utgjorde tre rækstrakter som ble fordelt videre mellom fire løsningsmidler av ulik polaritet. Roten ble ekstrahert på samme måte, og rækstraktet ble fordelt mellom diklormetan-etylacetat (organisk fase) og vann. Renstoff ble isolert fra blad etylacetat ekstrakt og rot organisk ekstrakt ved normal- og omvendt fase kolonnekromatografi (VersaFlash kolonneseparasjon og preparativ HPLC) og sentrifugalt akselerert tynnsjikt-kromatografi. De isolerte forbindelsene ble strukturoppklart ved hjelp av ^1H - og ^{13}C -NMR-spektroskopi. For de nye naturstoffene ble det i tillegg benyttet COSY-, HSQC- OG HMBC-NMR-spektroskopi, samt massespektroskopi.

3,5-dikaffeoylkinasyre, 6"-O-acetyl-isoquercitrin (quercetin-3-(6-O-acetyl)-glukosid), isorhamnetin, kaempferol og quercetin ble isolert fra blad etylacetat ekstraktet, og alle var tidligere beskrevet i planten. Det ble også isolert seks labdan-type diterpener fra roten, hvorav fem ikke er rapportert i planten tidligere. I tillegg er tre av dem nye naturstoffer. Av alle isolerte stoffer var det kun solidagenon som var isolert fra roten tidligere.

Rækstaktene og ekstrakter resultert fra disse, enkelte mellomfraksjoner, isolerte stoffer fra bladene og solidagenon ble testet for radikalfangende aktivitet overfor radikalet 1,1-difenylpicrylhydrazyl (DPPH-test). Disse ble i tillegg testet for hemming av 15-lipoksygenase (15-LO) fra soyabønner. Brine Shrimp Lethality (toksisitetstest) ble også utført for rækstraktene og solidagenon.

De polare ekstrakter fra rækstraktene viste å ha høyere radikalfangende aktivitet enn de upolare ekstraktene, unntatt stengel vannekstrakt som var inaktiv. Det var blad etylacetat ekstrakt, blad butanol ekstrakt, rot organisk fase ekstrakt og stengel etylacetat ekstrakt som hadde høyest aktivitet med hensyn på hemming av 15-LO. Blant de isolerte stoffene var

quercetin og isorhamnetin de mest potente både som radikalfanger og 15-LO-hemmer. Råekstraktene og solidagenon viste liten grad av toksisitet i lave doser.

2 Forkortelser

Tabell 2.1 *Oversikt over forkortelser i oppgaven*

<i>Forkortelse</i>	<i>Fullstendig betegnelse</i>
15-LO	15-lipoksygenase
4-HNE	4-hydroksynonenal
APCI	Atmosfæretrykk-kjemisk-ionisasjon
ATP	Attached proton test
BE	Blad etylacetat ekstrakt
BuOH	Butanol
C	Karbon
CA-TLC	Sentrifugalt akselerert tynnsjikt-kromatografi
CD3OD	Deutert metanol
CDCl ₃	Deutert kloroform
COSY	Korrelasjonspektroskopi
DCM	Diklormetan
DMSO	Dimetylsulfoksid
DMSO-d ₆	Heksadeuterodimetylsulfoksid
DPPH	1,1-Difenyl-2-picrylhydrazyl
EI	Elektronionisering
ESI	Elektrosprayionisasjon
EtOAc	Etylacetat
FI	Farmasøytisk institutt
GST	Glutathione S-transferase
H	Hydrogen
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPETE	Hydroperoksyekosatetraensyre
HPLC	Høytrykksvæskerkromatografi
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC ₅₀	Konsentrasjonen som gir 50 % radikalscavenging eller 50 % hemming av 15-lipoksygenase.
LC ₅₀	Konsentrasjonen som gir 50 % dødelighet.
LC-MS	Væskerkromatografi koblet til et MS-apparat.
LDL	Low-density lipoprotein
M	Molekylvekt/molekylmassen
MDA	Malondialdehyd
MS	Massespektrometri
NMR	Nukleær magnetisk resonans
RO	Rot organisk ekstrakt
ROS	Reaktive oksygen species
RP	Reverse phase
<i>S. canadensis</i>	<i>Solidago canadensis</i>
<i>S. gigantea</i>	<i>Solidago gigantea</i>
<i>S. virgaurea</i>	<i>Solidago virgaurea</i>
SABIMA	Samarbeidsrådet for biologisk mangfold
SD	Standardavvik
TLC	Tynnsjikt-kromatografi
TMS	Tetrametylsilan
UV	Ultrafiolett

3 Hensikt med oppgaven

Naturen er kompleks og mangfoldig. I tusenvis av år har menneskene brukt naturen som kilder til legemidler (Cragg *et al.*, 2002). I dag er det minst 80 % av verdens befolkning i utviklingsland som bruker plantematerialer til å kurere eller lindre sykdommer (Cordell *et al.*, 2005), og mange av disse plantematerialene kan inneholde mye antioksidanter.

Antioksidantene har i de siste årene fått mye oppmerksomhet både i media og på internett. Disse blir solgt overalt hvor man enn befinner. Dette har flere årsaker. Mye av den voksende interessen blant befolkningen kan forklares med økt kunnskap om antioksidantenes virkning, ansvarsfølelse for egen helse og håpet om en forlenget ungdom, men også med intensiv markedsføring.

Frie radikaler og reaktive oksygenspecies er knyttet til utvikling av en rekke patologiske tilstander. Det er derfor av stor viktighet å fortsette å søke etter nye forbindelser med antioksidative egenskaper i naturen som kan virke inn på de nevnte tilstandene.

Mange viltvoksende plantearter har gjennom tidene blitt brukt til mat og i folkemedisinsk sammenheng, men i Norge er det gjort få undersøkelser av innholdet i dem (Røthe, 2007). Av denne grunn kan det å forske på slike planter øke sjansen for å oppdage nye substanser med antioksidanteffekter eller andre nyttige biologiske aktiviteter.

Målet med oppgaven er å isolere og identifisere aktuelle substanser i den viltvoksende planten *Solidago canadensis* (Kanadagullris), samt studere effekter av planteekstrakter og rene stoffer i utvalgte bioassay. Antioksidant- og radikalfangende effekt vil bli studert, likeså hemmingseffekt på enzymet 15-lipoksygenase. Ettersom det er en god korrelasjon mellom toksisitet på rekellarver (toksisitetstest) og cytotoxsisiteten til noen kreftceller (McLaughlin *et al.*, 1998), vil det være aktuelt å utføre denne testen også.

4 Bakgrunn

4.1 *Solidago canadensis*

Solidago canadensis (*S. canadensis*) er en plante som er innført og forvillet i Norge og tilhører kurvplantefamilien. På norsk heter planten Kanadagullris. Den blir også beskrevet under det engelske navnet Canadian goldenrod (Plants for a future, 2004), (Hänsel *et al.*, 1994). Fullstendig systematikk, historikk, botanisk beskrivelse, habitat, reproduksjon og miljøproblem er gitt i punktene 4.1.1-4.1.5, samt oversikt over tradisjonell bruk og tidligere funn er gitt i punktene 4.1.6 og 4.1.7.

4.1.1 Systematikk (Wikipedia, 2007), (Rook, 2002)

Rike:	Plantae (planteriket)
Divisjon:	Magnoliophyta (blomsterplanter, dekkfrøet)
Klasse:	Magnoliopsida (tofrøbladet)
Underklasse:	Asteridae
Orden:	Asterales (kurvplanter)
Familie:	Asteraceae (kurvplante)
Slekt:	<i>Solidago</i> (gullris)
Art:	<i>S. canadensis</i> L.

4.1.2 Historikk

S. canadensis er opprinnelig fra Nord-Amerika (Huang *et al.*, 2007), (SABIMA, 2007), (Wikipedia, 2007), (Altug, 2003), men ble introdusert til Norge og Europa som hageplante. Fra hagene har planten på grunn av sin sprednings- og konkurranseevne spredt seg ut i kulturlandskapet og er blitt ganske vanlig her i Norge (Agder Naturmuseum og botanisk hage, 2007), (SABIMA, 2007). I følge SABIMA (Samarbeidsrådet for biologisk mangfold) ble *S. canadensis* introdusert til Europa i 1648, men det er uvisst når den kom til Norge. Det er antatt at den har blitt dyrket i Botanisk hage på Tøyen i Oslo siden 1820-årene (SABIMA, 2007), (Agder Naturmuseum og botanisk hage, 2007).

4.1.3 Botaniske forhold

S. canadensis er en flerårig medisinskeplante med en tydelig rot som har tette og tynne tråder og en lang horisontal rotstokk (rhizom). Denne rotstokken sikrer en rask, invasiv og vegetativt spredning (Dobjanschi *et al.*, 2005). Planten kan bli 0,5 til 1,5 meter høy, og kjennetegnes ved rak stengel som er ugreinet nedenfor blomsterstanden (Hänsel *et al.*, 1994), (Huang *et al.*, 2007), (SABIMA, 2007). Fra midten av planten og oppover er stengelen dekket av tette hår. Bladene er avlange og er ca 2 dm lange. Grunnbladene er lansettformede, mens stengelbladene er mer linjeformede. Blomstene er små og har en sterk gul farge. De vokser i små kurver som er ca 5 mm lange, og kurvene sitter tett på oversiden av greinene (SABIMA, 2007), (Wikipedia, 2007), (Agder Naturmuseum og botanisk hage, 2007). Planten blomster på sensommeren fra august til oktober, og frukten er omtrent 1 mm i lengden og modnes fra september til oktober. (Plants for a future, 2004), (Huang *et al.*, 2007).

Bilder av forskjellige plantedeler ble tatt i Oslo høsten 2007 av forfatteren og er vist i Figur 4.1.1-4.1.5.



Figur 4.1.1 Bestand av *S. canadensis*



Figur 4.1.2 *S. canadensis* blomsterknopper (til venstre) og delvis utblomstring (til høyre)



Figur 4.1.3 *S. canadensis* full utblomstring (til venstre) og umodne frukter (til høyre)



Figur 4.1.4 *S. canadensis* blad



Figur 4.1.5 *S. canadensis* stengel dekket med hår (til venstre) og rotstokk med utløpere (til høyre)

4.1.4 Habitat

Som nevnt tidligere har *S. canadensis* sin opprinnelse i Nord-Amerika hvor den forekommer i nesten hver eneste delstat i USA og tvers igjennom Canada. Planten er nå utbredt i store deler av Europa og Kina hvor den også ble introdusert som hageplante i 1935 (Hänsel *et al.*, 1994), (Huang *et al.*, 2007), (Wikipedia, 2007), (Rook, 2002).

S. canadensis er varmekjær og trives i områder med kalkrik grunn (SABIMA, 2007). Plantens voksested varierer fra enger til åpen skog og steinete jord (Schofield, 1989). I Norge vokser planten hovedsakelig på Østlandet nord til Lillehammer, men den har også blitt oppdaget langs kysten nord til Nordland. Den finnes stort sett i grasenger, skogkanter, grøftekanter, langs jernbane og på skrotemark (SABIMA, 2007), (Agder Naturmuseum og botanisk hage, 2007).

4.1.5 Reproduksjon og miljøproblem

Blomstene til *S. canadensis* er hermafroditiske, det vil si at de har både hann- og hunnkjønn organer. De er pollinert av insekter. Planten er derfor selvbefruktet (Plants for a future, 2004). Den reprodukeres ved hjelp av frø som er vindspredd og vegetativt av rotstokker (rhizomer) som danner rotskudd. Disse rotskuddene danner videre store kloner som kan bli flere tiår gamle. Produksjonen av frø er enorm og hvert enkelt skudd kan produsere mer enn 10 000

frø. Frøene har en vid toleranse for ulike pH-verdier, saltholdige og fuktige jord. De er lettvinget og spres derfor lett av luft, vann, transportmidler eller menneskeaktiviteter. Frøene kan spires godt under forskjellige miljømessige forhold (Huang *et al.*, 2007),(SABIMA, 2007).

S. canadensis har meget stor formerings- og spredningsevne. Den kan danne tette bestander med over 300 skudd per kvadratmeter. Av denne grunn er planten en farlig ekspansiv art som kan utkonkurrere naturlig vegetasjon, og kan dermed bli en trussel for mye av det gamle kulturlandskapets biomangfold. I Kina har den allerede blitt et invasivt ugress og har forårsaket alvorlige ødeleggelser av jordbruk og økosystemer der (Huang *et al.*, 2007), (SABIMA, 2007). Her i Norge står den oppført på Norsk svarteliste. Dette er en liste som gir en oversikt over økologiske risikovurderinger av fremmede arter og er utarbeidet av Artsdatabanken i 2007 (Artsdatabanken, 2007).

Spredning av planten kan bekjempes med gjentatt slått, og dette må gjøres minst to ganger i året. Sprøyting eller tildekking med svart plast etter slått har vist seg å være effektivt (SABIMA, 2007).

4.1.6 Tradisjonell bruk

Solidago er gresk og betyr å helbrede. Plantene har fått dette slektnavnet fordi det er antatt at de har helbredende egenskaper (Grae, 1974).

S. canadensis er en nyttig medisinsplante som også kan brukes til mat. Unge blad og blomstrende stengler har blitt laget suppe av. Frøene ble benyttet som fortykningsmiddel i supper, men også som mat. Det har blitt laget te av blomstene og/ eller bladene (Schofield, 1989), (Foster *et al.*, 1990), (Facciola, 1990).

Planten har hatt en lang historie i folkemedisinsk bruk i de områder der hvor den vokser. Den har sammen med *S. gigantea* blitt brukt medisinsk som *Solidaginis herba* eller på engelsk Goldenrod herb. Denne drogen består av overjordiske deler til begge plantene som blir innsamlet under blomstringssesongen og tørket med forsiktighet. Det er rapportert at *Solidaginis herba* har samme effekt som *Solidaginis virgaurea herba*, hvor den sist nevnte urten består kun av overjordiske deler til *S. virgaurea*. Begge urtene er blitt brukt mot inflammatoriske sykdommer i nedre urinveissystem, og som profylakse og i behandling av

stein i urinveiene og nyregrus. Deres virkning er diuretisk, mild antispasmodisk og antiflogistisk (Altug, 2003), (Blumenthal *et al.*, 1998), (Hänsel *et al.*, 1994).

S. canadensis alene har også blitt brukt med andre indikasjoner i tradisjonell medisin. En oversikt over dette er gitt i Tabell 4.1.1.

Tabell 4.1.1 Tradisjonell medisinsk bruk av *S. canadensis*

Indikasjon	Plantedel og tilberedning	Referanser
Antiflogistisk	Ikke oppgitt	(Apáti <i>et al.</i> , 2003)
Antiseptisk	Friske blad som ble tygget	(Schofield, 1989)
	Ekstrakt av kokte blad og stengler	(Grae, 1974)
	Pulver av tørkede blad og stengler	
Antispasmodisk middel	Ikke oppgitt	(Smith, 1933)
Antibakteriell	Ikke oppgitt	(Li, 2002)
Blodstillende (styptisk) middel	Pulver av tørkede blad	(Schofield, 1989), (Foster <i>et al.</i> , 1990)
Blærebetennelse	Ikke oppgitt	(Apáti <i>et al.</i> , 2003)
Brannsår	Grøtomslag av røtter applisert på sår	(Schofield, 1989)
Diare	Infusjon av blomster hoder	(Moerman, 1998)
Feberstillende	Te av blomster	(Foster <i>et al.</i> , 1990)
Gastrointestinal og lever hjelpemiddel	Infusjon av blomster	(Moerman, 1998)
Intestinal astringent	Te	(Smith, 1933)
Nyrebetennelse	Ikke oppgitt	(Apáti <i>et al.</i> , 2003)
Mot blødning ved nyrebetennelse	Urten inneholder Quercetin, nyttig ved behandling av nevnte tilstand	(Foster <i>et al.</i> , 1990)
Rheumatisme	Ikke oppgitt	(Apáti <i>et al.</i> , 2003)
Slangebitt	Te av blomster	(Foster <i>et al.</i> , 1990)
Smertestillende	Infusjon av blomst og rot	(Bradette-Hebert <i>et al.</i> , 2008), (Moerman, 1998)
Sår hals	Tyggede blomster	(Foster <i>et al.</i> , 1990), (Weiner, 1980)
Tannverk	Rot	(Lewis <i>et al.</i> , 2003)
Urolithiasis	Ikke oppgitt	(Apáti <i>et al.</i> , 2003)
Åpen sår (ulcer)	Te av tørkede blad som ble drukket	(Schofield, 1989)

4.1.7 Tidligere funn

S. canadensis har vært av både kjemisk og medisinsk interesse i lang tid blant forskerne fra forskjellige verdensdeler. Det har derfor blitt gjort forholdsvis mye arbeid på planten, spesielt den overjordiske delen. Dette har videre ført til at mange innholdsstoffer er identifisert og strukturopklart, og det har også blitt oppdaget at planten har forskjellige biologiske aktiviteter.

4.1.7.1 Identifiserte innholdsstoffer

Mange forbindelser har blitt isolert fra *S. canadensis*. I Tabell 4.1.2 er det gitt en oversikt over de kjemiske forbindelsene som er isolert og identifisert til nå.

Tabell 4.1.2 Oversikt over isolerte forbindelser

Kjemisk gruppe	Komponent	Plantedel	Kilder
Acetylen	(Z-Z)-matricaria ester	Rot	(Lam <i>et al.</i> , 1992)
Flavonoid	Hyperosid	Overjordisk	(Apati <i>et al.</i> , 2003)
	Isoquercitrin	Overjordisk	(Apati <i>et al.</i> , 2003)
	Isorhamnetin	Overjordisk	(Apáti <i>et al.</i> , 2004)
	Isorhamnetin-3-O- β -glukosid	Overjordisk	(Apáti <i>et al.</i> , 2004)
	Isorhamnetin-3-(6"-O-acetyl)- β -glukopyranosid	Overjordisk	(Apáti <i>et al.</i> , 2004)
	Isorhamnetin-3-O- β -rutinosid	Overjordisk	(Papp <i>et al.</i> , 2004)
	Kaempferol	Overjordisk	(Apáti <i>et al.</i> , 2004)
	Kaempferol-3-O- β -glukosid	Overjordisk	(Apáti <i>et al.</i> , 2004)
	Kaempferol-3-O- β -galaktosid	Overjordisk	(Apáti <i>et al.</i> , 2004)
	Kaempferol-3-O- β -rutinose (nicotiflorin)	Overjordisk	(Apáti <i>et al.</i> , 2004)
	Kaempferol-3-(6"-O-acetyl)- β -glukopyranosid	Overjordisk	(Apáti <i>et al.</i> , 2004)
	Kaempferol-3-O- β -robinobiosid	Overjordisk	(Apáti <i>et al.</i> , 2004)
	Kaempferol-3-O- β -rhamnoside	Overjordisk	(Papp <i>et al.</i> , 2004),(Apáti <i>et al.</i> , 2004)
	Quercetin	Blomst	(Bradette-Hebert <i>et al.</i> , 2008)
	Quercetin-3- β -galaktosid	Overjordisk	(Budzianowski <i>et al.</i> , 1990)
	Quercetin-3-(6"-O-acetyl)- β -glucopyranosid	Overjordisk	(Apáti <i>et al.</i> , 2004)
	Quercetin-3-O- β -robinobiosid	Overjordisk	(Apáti <i>et al.</i> , 2004)
	Quercitrin	Overjordisk	(Apati <i>et al.</i> , 2006)
	Rhamnetin-3-O- β -glucorhamnosid	Overjordisk	(Apáti <i>et al.</i> , 2004)
	Rutin	Overjordisk	(Apati <i>et al.</i> , 2006)
Fenoliske glykosid	2'-hydroxy-4',6'-di-O- β -D-glukopyranosyl-butyrophenon	Overjordisk	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)
Fenoliske syrer	Kaffesyre	Tørket plantemateriale	(Kalembe, 1992)
	Ferulasyre	Tørket plantemateriale	(Kalembe, 1992)
	p-Kumarsyre	Tørket plantemateriale	(Kalembe, 1992)
	p-Hydroxybenzosyre	Tørket plantemateriale	(Kalembe, 1992)
	Protokatekusyre	Tørket plantemateriale	(Kalembe, 1992)
	Salisylsyre	Tørket plantemateriale	(Kalembe, 1992)
	Sinapinsyre	Tørket plantemateriale	(Kalembe, 1992)
	Syringasyre , vaniljesyre	Tørket plantemateriale	(Kalembe, 1992)

Tabell 4.1.2 fortsetter

Klorogensyre og derivater	Kaffesyre	Overjordiske	(Apati <i>et al.</i> , 2003)
	Klorogensyre	Overjordiske	(Apati <i>et al.</i> , 2003)
	3-O-kaffeoylkinasyre	Blomst	(Bradette-Hebert <i>et al.</i> , 2008)
	5-O-kaffeoylkinasyre	Blomst	(Bradette-Hebert <i>et al.</i> , 2008)
	4,5-di-O-kaffeoylkinasyre	Blomst	(Bradette-Hebert <i>et al.</i> , 2008)
	3,5-di-O-kaffeoylkinasyre	Blomst	(Bradette-Hebert <i>et al.</i> , 2008)
	3,4-di-O-kaffeoylkinasyre	Blomst	(Bradette-Hebert <i>et al.</i> , 2008)
Polysakkarider og sukker	Arabinogalaktan	Ikke oppgitt	(Bode <i>et al.</i> , 1989)
	Nøytrale polysakkarider med inulinliknende bindingstype	Ikke oppgitt	(Franz, 1987)
	Blanding av pektinliknende polysakkarider	Ikke oppgitt	(Franz, 1987)
	Inulin	Rot	(Houston <i>et al.</i> , 1948)
	D-Glukose	Ikke oppgitt	(Murach <i>et al.</i> , 1975)
	D-Xylose	Ikke oppgitt	(Murach <i>et al.</i> , 1975)
	L-Rhamnose	Ikke oppgitt	(Murach <i>et al.</i> , 1975)
Polyacetylen	Angeloymatricariaester	Rot	(Lu <i>et al.</i> , 1993)
	cis-8-Dehydromatricariaester	Rot	(Lu <i>et al.</i> , 1993)
	cis-Dehydromatricarialactone	Rot	(Lu <i>et al.</i> , 1993)
	Tigloylmatricariaester	Rot	(Lu <i>et al.</i> , 1993)
Saponiner	Bayogenin	Ikke oppgitt	(Murach <i>et al.</i> , 1975),
	Canadensissaponin 1	Overjordiske	(Hiller <i>et al.</i> , 1991)
	Canadensissaponin 2	Overjordiske	(Hiller <i>et al.</i> , 1991)
	Canadensissaponin 3	Overjordiske	(Hiller <i>et al.</i> , 1991)
	Canadensissaponin 4	Overjordiske	(Hiller <i>et al.</i> , 1991)
	Canadensissaponin 5	Overjordiske	(Reznicek <i>et al.</i> , 1992),(Hiller <i>et al.</i> , 1991)
	Canadensissaponin 6	Overjordiske	(Reznicek <i>et al.</i> , 1992),(Hiller <i>et al.</i> , 1991)
	Canadensissaponin 7	Overjordiske	(Reznicek <i>et al.</i> , 1992),(Hiller <i>et al.</i> , 1991)
	Canadensissaponin 8	Overjordiske	(Reznicek <i>et al.</i> , 1992),(Hiller <i>et al.</i> , 1991)
	Genin D	Ikke oppgitt	(Murach <i>et al.</i> , 1975)
	Genin H	Ikke oppgitt	(Murach <i>et al.</i> , 1975)
	Sapogenin	Blad	(Burrell <i>et al.</i> , 1948)
	Saponin B, E, F, G	Rot	(Rastogi <i>et al.</i> , 1993)
Diterpen	13 E-7 α -Acetoxylkolavensyre	Rot	(Lu <i>et al.</i> , 1993)
	13 Z-7 α -Acetoxylkolavensyre	Rot	(Lu <i>et al.</i> , 1993)
	6 β -Angeloyloxykolavensyre	Rot	(Lu <i>et al.</i> , 1993)
	6 β ,15-Dihydroxy- <i>ent</i> -labda-7,8,13,14(Z)-diene	Rot	(Bohlmann <i>et al.</i> , 1980)
	15-Hydroxy- <i>ent</i> -labda-7,8,13,14(Z)-dien-6-one	Rot	(Bohlmann <i>et al.</i> , 1980)
	Diterpen alkohol m/smp. 168,5-169,5°	Rot	(Krepinsky <i>et al.</i> , 1962)
	Kolavensyre	Rot	(Lu <i>et al.</i> , 1993)
	Kolavenol	Rot	(Lu <i>et al.</i> , 1993)
	Solicanolid	Blomst	(Bradette-Hebert <i>et al.</i> , 2008)
	Solidago diterpen A	Rot	(Rastogi <i>et al.</i> , 1993)
	Solidagenon	Rot	(Anthonsen <i>et al.</i> , 1967)
	Solidago lacton	Rot	(Lu <i>et al.</i> , 1993)
	Solidagenon spiro eter	Rot	(Anthonsen, 1969)

Tabell 4.1.2 fortsetter

Diterpen	6 β -Tigloyloxykolavensyre	Rot	(Lu et al., 1993)
Triterpener	3 β -(3R-acetoxylhexa-decanoyloxy)-lup-20(29)-en	Rot og stengel	(Chaturvedula et al., 2004)
	3 β -(3-ketohexa-decanoyloxy)-lup-20(29)-en	Rot og stengel	(Chaturvedula et al., 2004)
	3 β -(3R-acetoxylhexadecanoyloxy)-29-nor-lupan-20-on	Rot og stengel	(Chaturvedula et al., 2004)
	3 β -(3-ketohexadecanoyloxy)-29-nor-lupan-20-on	Rot og stengel	(Chaturvedula et al., 2004)
	Triterpen-alkohol m/ smp. 214-215°	Rot	(Krepinsky et al., 1962)
Komponenter i eteriske oljer	(E)-Nerolidol	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	(E)-Ocimen	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	(E)- β -Ocimen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	1- <i>epi</i> -Cubenol	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	6- <i>epi</i> -Cubenol	Eterisk olje	(Kasali et al., 2002)
	6- <i>epi</i> - α -Cuben	Eterisk olje	(Kasali et al., 2002)
	6- <i>epi</i> - β -Cuben	Eterisk olje	(Kasali et al., 2002)
	Amorphen	Eterisk olje	(Kasali et al., 2002)
	Ar-curcumen	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	Aromadendren	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	Ar-turmeron	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	Fenylacetataldehyd	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Bicyclogermacren	Eterisk olje	(Kasali et al., 2002)
	Bornyl acetat	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Bornyl acetat	Eterisk olje	(Kasali et al., 2002)
	Camphen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	<i>cis</i> -Jasmon	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	<i>cis</i> -Sabinen hydrat	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Cubebol	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Cyclocoloren	Ikke oppgitt	(Krepinsky et al., 1962)
	Curlon	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	Elemol	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	<i>epi</i> -Cubebol	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	<i>epi</i> - α -Cadinol	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Germacren B	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Germacren D	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Germacren D-4-ol	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Guaiol	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Limonen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Linalool	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Myrcen	Eterisk olje	(Kasali et al., 2002)
	<i>p</i> -Cymen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Sabinen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Selin-11-en-4- α -ol	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Spathulenol	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	Terpinen-4-ol	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	Terpinolen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	T-muurolol + T-cadinol	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	<i>trans</i> - β -Guaien	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	α -Cadinen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)

Tabell 4.1.2 fortsetter

Komponenter i eteriske oljer fortsetter	α -cadinol	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	α -cis-bergamotten	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	α -Humulen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	α -Muurolen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	α -Phellandren	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	α -Pinen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	α -Terpincol	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	α -Terpinen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	α -trans-bergamoten	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	α -zingiberen	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	β -bisalolen	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	β -Bourbonen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	β -Bulnesen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	β -Caryophyllen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	β -cis-bergamotten	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	β -Cubeben	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	β -Elemen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	β -Eudesmol	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	β -Gurjunen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	β -Myrcen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	β -Pinen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	β -Selinen	Eterisk olje	(Kasali et al., 2002)
	β -sesquiphellandren	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	β -trans-bergamotten	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	β -Ylangen	Eterisk olje	(Kasali et al., 2002)
	β -Ylangen	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	γ -Cadinen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	γ -Elemene	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	γ -Muurolen	Eterisk olje	(Weyerstahl et al., 1993)
	γ -Terpinen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	δ -Cadinen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
	δ -Elemen	Eterisk olje	(Chanotiya et al., 2008)
Triterpener fortsetter	Cycleartenol	Rot og stengel	(Chaturvedula et al., 2004)
	Cycloartenyl palmitat	Rot og stengel	(Chaturvedula et al., 2004)
	Lupeol	Rot og stengel	(Chaturvedula et al., 2004)
	Lupeyl acetat	Rot og stengel	(Chaturvedula et al., 2004)
	Stigmasterol	Rot og stengel	(Chaturvedula et al., 2004)
	Ursolsyre	Rot og stengel	(Chaturvedula et al., 2004)
	α -Amyrin acetate	Rot og stengel	(Chaturvedula et al., 2004)

4.1.7.2 Biologisk aktivitet

Planten har lenge vært kjent for å være rik på flavonoider. Dens overjordiske del har blitt brukt i flere århundre som et anti-inflammatorisk og diuretisk middel ved blære- og nyresykdommer. Dette kan skyldes dens innhold av flavonoider og saponiner (Apati *et al.*, 2006). Under følger en oversikt over en del interessante biologiske aktiviteter som er funnet i planten hittil.

Antioksidant aktivitet

-Metanol ekstrakt av *S. canadensis* viste seg å ha bedre antioksidant aktivitet enn grønn te, askorbinsyre og Trolox (Jiang *et al.*, 2006).

-Det er også blitt påvist in-vitro at tinktur (70 % v/v etanol) og infusjon av *S. canadensis*, har høye antioksidante aktiviteter (Apáti *et al.*, 2003).

Hemming av lyase aktivitet

- Triterpenoider og lupeol fra rot og stengel til *S. canadensis* er vist i bioassay å gi en aktiv hemming av lyase aktiviteten til DNA polymerase β (Chaturvedula *et al.*, 2004).

Antitumor aktivitet

-To fraksjoner av vannløselige polysakkarider fra *S. canadensis* ble testet for antitumor aktivitet. Den ene nøytrale polysakkaridfraksjonen som var en homogen fraksjon med en inulinliknende bindingstype, viste en hemmingseffekt av Sarcoma 180 på 80 % ved en dose på 25 mg/kg, mens den andre sure polysakkaridfraksjonen med en pektinliknende blanding av galacturonaner med forskjellige kjedelengder, var mindre effektiv og hadde en hemmingseffekt på 72 % ved samme dose (Franz, 1987).

Påvirkning av glutathione S-transferase

-Glutathione S-transferase (GST) er et viktig enzym i fase II legemiddel metabolisme, og er en betydelig komponent av cellulær antioksidant-forsvarsmekanismer. Glykosidene rutin og quercitrin som var isolert fra den overjordiske delen til *S. canadensis*, gav en doseavhengig økning av GST aktivitet, mens aglykonet quercetin gav en hemmingseffekt av enzymet (Apati *et al.*, 2006).

Gastroprotektiv effekt

-Solidagenon er vist å ha en statistisk signifikant gastroprotektiv effekt ved en oral dose på 100 mg/kg sammenliknet med lanzoprazol ved en dose på 20 mg/kg. Testen ble utført i mus (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2002).

Diuretisk effekt

-Fraksjon av flavonoider isolert fra blomster til *S. canadensis*, ble administrert per oralt i rotter. Resultatet viste at fraksjonen hadde en diuretisk aktivitet (Chodera *et al.*, 1991).

Antifungal aktivitet

-Det er påvist at solidagenon har antifungal aktivitet (Benevides *et al.*, 2004).

Cytotoksisk effekt

-Solidagenon har vist å ha en høy cytotoksisk effekt med et IC₅₀-område fra 42-115 µM i cellekultur (Rodriguez *et al.*, 2005).

Andre biologiske aktiviteter

Denne oppgaven har vist at *S. canadensis* inneholder mye 3,5-dikaffeoylkinasyre. Det er rapportert at denne forbindelsen har en rekke interessante biologiske aktiviteter. Eksempelvis er hemming av HIV (Human Immunodeficiency Virus) Type 1 integrase in vitro, hindring av HIV replikasjon i vevskultur (McDougall *et al.*, 1998), hemming av tyrosinase aktivitet (Iwai *et al.*, 2004), neuroprotektive egenskaper (Kim *et al.*, 2005) og en hemmende RSV (Respiratory syncytial virus) aktivitet (Ooi *et al.*, 2006).

4.2 Antioksidanter og frie radikaler

4.2.1 Antioksidanter

En antioksidant er definert som enhver substans som forsinker eller signifikant hindrer oksidasjonen av et oksiderbart substrat, når den foreligger i vesentlig lavere konsentrasjon enn det oksiderbare substratet (Halliwell *et al.*, 2007), (Halliwell, 2005). Eksempler på oksiderbare substrater er karbohydrater, fettsyrer, proteiner og DNA. Antioksidanter er med på å beskytte kroppen mot frie radikaler og skadelige oksygenforbindelser. De virker ved å

hemme dannelse av reaktive oksygen species (ROS), direkte fange opp frie radikaler eller ved å styrke cellens eget antioksidantforsvar (Kerr *et al.*, 1996; Blomhoff, 2007).

4.2.2 Frie radikaler og reaktive oksygen species

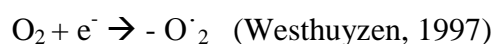
Et fritt radikal er et atom eller molekyl med et eller flere uparrede elektroner som har evnen til å eksistere som et fritt molekyl (Halliwell *et al.*, 2007), (Halliwell, 1994), (Ansari, 1996). Frie radikaler er vanligvis ustabile, har kort levetid og er meget reaktive. Dette skyldes deres unike kjemiske struktur. De kan reagere med nærliggende ikke-radikaler enten ved å oksidere eller redusere dem, og vil lede til dannelse av nye frie radikaler (Ansari, 1996). Viktige frie radikaler er superoksid ($O_2^{\cdot-}$) og hydroksylradikal ($\cdot OH$) (Halliwell, 2005).

Begrepet reaktive oksygen species (ROS) er mye brukt i biomedisinsk litteratur, og det omfatter både oksygensentrert radikaler og ikke-radikale derivater av oksygen. Eksempler på disse er hydrogenperoksid (H_2O_2), singlett oksygen (1O_2) og HOCl (Halliwell, 2005). Ikke-radikal ROS er vanligvis ikke like reaktiv som frie radikaler, men de inneholder oksygen og kan delta selektivt i produksjonen av frie radikaler (Kerr *et al.*, 1996).

4.2.3 Dannelse av frie radikaler og ROS

Dannelse av frie radikaler og andre oksygenforbindelser er et resultat av en normal oksidativ metabolisme. Frie radikaler dannes i mitokondrier, lysosomer, cellemembraner, endoplasmatiske retikulum og cytosol. De utøver ikke bare skadelige virkninger, men er også viktige signalmolekyler og har betydning i kroppens forsvar mot blant annet bakterielle infeksjoner (Blomhoff, 2007).

Superoksid er et fritt radikal, men har relativt liten reaktivitet. Det dannes ved en reduksjon av molekylært oksygen til vann katalysert av cytokrom oksidase i elektrontransportkjeden i mitokondriene (Blomhoff, 2007), (Halliwell, 1994; Fridovich, 2001).

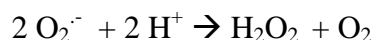


Superoksidet dannes også i fagocytiske celler og hjelper dem til å inaktivere eller drepe bakterier og virus (Halliwell, 1994), (Halliwell, 2005). Et viktig molekyl som reagerer med superoksid i menneskekroppen, er nitrogenoksid ($NO\cdot$) som produseres av vaskulære

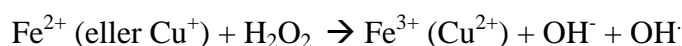
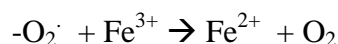
endotelceller. Dette molekylet har mange viktige funksjoner, som regulering av blodtrykket og kan være involvert i utryddelse av parasitter. Overskudd av NO[•] kan være direkte toksisk ved at det skader jern-svovel proteiner. Når det reagerer med superoksid, dannes det peroksinitritt (NOO[•]) som kan forårsake direkte biologiske skader ved å oksidere SH-grupper. Ved fysiologiske pH kan den også protoneres og dekomponere til giftige produkter som nitrogendioksid (NO₂), hydroksylradikal og nitroniumion (NO₂⁺) (Halliwell, 1994), (Halliwell, 2005). Andre oksiderende enzymsystemer som xantin oksidase og NADPH-oksidase genererer også superoksider (Blomhoff, 2007).

Et av de mest reaktive frie radikaler er hydroksylradikal (•OH), og det kan reagere med nesten alle levende celler. Dersom levende organismer blir utsatt for ioniserende stråling, vil O-H bindinger i vann splittes og det dannes •OH og •H (Halliwell, 1994), (Halliwell, 2005).

Hydrogenperoksid (H₂O₂) er ikke et fritt radikal; det inneholder ikke uparede elektroner (Blomhoff, 2007). Det blir dannet in vivo fra O₂^{•-} ved en dismutasereaksjon (Halliwell, 2005).



I tillegg blir hydrogenperoksid også generert av flere oksidaseenzymer, f. eks xantin oksidase. Det er et lite reaktivt molekyl, men kan sammen med jern eller kobber ioner føre til dannelse av hydroksylradikal ved en metallkatalysert Haber-Weiss reaksjon (Halliwell, 2005), (Westhuyzen, 1997).



Singlett oksygen er ikke et radikal. Det blir dannet under fotosensitivisering og kjemiske reaksjoner, og kan være reaktivt (Devasagayam *et al.*, 2004).

Frie radikaler blir også dannet ved reaksjoner katalysert av syklooksygenaser, lipoksigenaser og monoaminoksidaser (Blomhoff, 2007). I tillegg blir det også dannet superoksid,

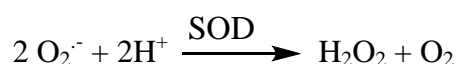
hydroksylradikal og hydrogenperoksid ved ischemisk-reperfusjon (se avsnitt 4.2.7.4 Ischemisk reperfusjon) (Devasagayam *et al.*, 2004).

4.2.4 Antioksidantforsvar

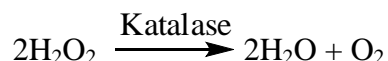
Kroppen har utviklet et omfattende forsvar mot oksidative skader. Forsvaret består av en rekke enzymatiske og ikke-enzymatiske komponenter som kan forebygge dannelse av frie radikaler, nøytralisere eller fjerne dem, reparere oksidative skader eller kompleksbinder metallioner slik at de ikke katalyserer autooksidasjonsreaksjoner (Blomhoff, 2007), (Halliwell *et al.*, 2007).

Enzymatiske antioksidanter:

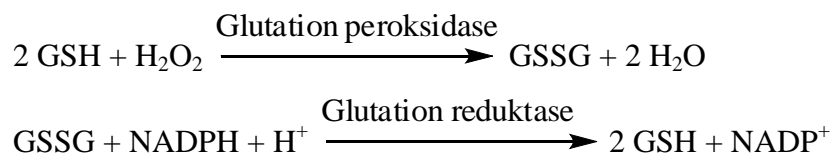
- Superoksid dismutase (SOD)
-er en av de mest effektivt intracellulære enzymatiske antioksidanter, og katalyserer omdannelse av superoksid til hydrogenperoksid (Halliwell, 2005).



- Katalase
-omdanner hydrogenperoksid til vann og oksygen (Halliwell, 2005), (Fridovich, 2001), (Rahman, 2007).



- Glutation peroksidase
-enzymet trenger selen for sin virkning, og fjerner hydrogenperoksid ved å bruke det til å oksidere redusert glutathion (GSH) til oksidert glutathion (GSSG). GSSG kan igjen bli omdannet til GSH av glutathion reduktase og NADPH (Fridovich, 2001), (Rahman, 2007).



Ikke-enzymatiske antioksidanter

- Vitamin C (askorbinsyre)
-er en kraftig vannløselig antioksidant og utøver sin effekt i vannløselige miljø. Det genererer vitamin E i membraner og lipoproteiner og øker også intracellulære nivåer

av glutation (Rahman, 2007). Vitamin C har in vitro vist også å ha pro-oksidant egenskaper. Det kan dermed øke lipidperoksidering og andre oksidative skader (Halliwell *et al.*, 2007).

- Vitamin E (α -tokoferol)
-er en viktig fettløselig antioksidant. OH-gruppen i E-vitaminets 2-posisjon er det aktive stedet, og kan redusere frie radikaler og lipidperoksidasjonsprodukter. Når vitamin E reagerer med et radikal, blir det dannet vitamin E-radikal. Radikalet blir så redusert til sin opprinnelige vitamin E form ved hjelp av vitamin C (Blomhoff, 2007),(Rahman, 2007).
- Glutation
-er en multifunksjonell intracellulær antioksidant og finnes i cytosol, cellekjernen og mitokondriene. Det kan virke som en co-faktor for mange detoksifiseringsenzymmer, direkte fange hydroksylradikal og singlett oksygen, regenererer vitamin E og C til sine aktive former (Rahman, 2007).
- Melatonin
-er et neurohormon og kan virke radikalfangende i oksygenmetabolismen (Rahman, 2007).
- Selen
-er en essensiell komponent i flere antioksidantenzymmer, og den bidrar til cellenes egenproduserte antioksidantforsvar (Blomhoff, 2007).

Forbindelser som binder metallioner (Blomhoff, 2007), (Halliwell *et al.*, 2007),(Bjålie *et al.*, 1998)

- Albumin
-binder kobber
- Ceruloplasmin
-binder kobber
- Ferritin
-jernproteinforbindelser og er intracellulær lagringsform for jern
- Haptoglobin
-binder jern
- Lactoferrin
-jernbindende protein

- Transferrin
-binder jern

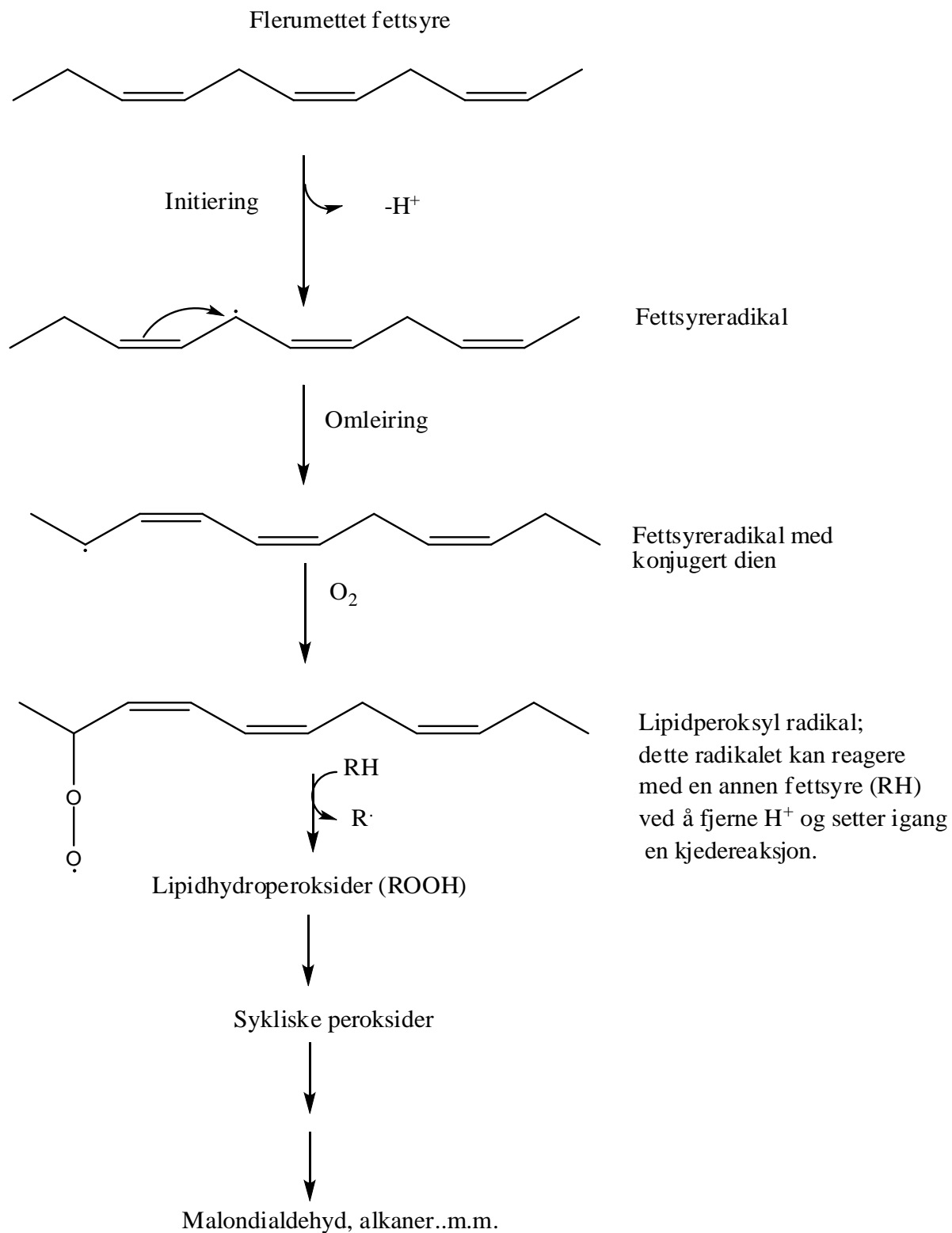
4.2.5 Oksidativt stress

Når kroppens antioksidantforsvar ikke lenger klarer å fjerne frie radikaler og ROS, oppstår det oksidativt stress. Dette kan skyldes lave nivåer av antioksidanter eller overproduksjon av ROS (Halliwell *et al.*, 2007), (Halliwell, 1994). Normalt vil det være en balanse mellom ROS og antioksidantforsvaret. Et mildt oksidativt stress kan tolereres av kroppens celler. Ved slike tilfeller vil cellene gjenopprette balansen ved å oppregulere syntesen av antioksidantforsvarssystemet. Når det er et alvorlig oksidativt stress kan det føre til alvorlige forstyrrelser i cellemetabolismen. Eksempler på dette kan være DNA skade, økning i intracellulært fritt kalsium, skade på ionetransportører og spesifikke proteiner og lipidperoksidering. Dette kan videre resultere i celledød (Halliwell, 1994).

4.2.6 Lipidperoksidering

Flerumettede fettsyrer består av to eller flere karbon-karbon dobbeltbindinger og de kan lett peroksidere på grunn av sin struktur. Lipidperoksideringen er en kjede av reaksjoner og foregår i biologiske membraner som er bygd opp av en stor mengde flerumettede fettsyrer (Halliwell *et al.*, 2007). Både membranlipider og proteiner kan bli angrepet og det kan skje ved en enzymatisk eller ikke-enzymatisk reaksjon (Westhuyzen, 1997). Enzymatisk lipidperoksidering er en kontrollert peroksidering av fettsyresubstratet og er katalysert av enzymerne syklooksygenaser og lipoksygenaser. Dette er omtalt i avsnitt 4.3 Arakidonsyremetabolisme og 15-LO.

Ikke-enzymatisk lipidperoksidering starter med at et fritt radikal fjerner et hydrogenatom fra en metylengruppe mellom to dobbeltbindinger i fettsyresidekjede, og det dannes et fettsyre radikal. Dette radikalet blir så stabilisert ved molekylær omleiring til et konjugert dien, og kan deretter reagere med molekylært oksygen slik at det dannes et lipidperoksyl radikal (ROO \cdot). Dette radikalet er svært reaktivt og kan angripe en ny fettsyrekjede og starter dermed en ny lipidperoksidering. Dette fører tilslutt til dannelse av flere lipidhydroperoksider og lipidradikaler (Halliwell *et al.*, 2007) (Figur 4.2.1).



Figur 4.2.1 Lipidperoksidering (Halliwell *et al.*, 2007)

Lipidperoksidering gir opphav til mange toksiske produkter som malondialdehyd (MDA), 4-hydroksynonenal (4-HNE) og andre alkaner (Devasagayam *et al.*, 2004).

4.2.7 Patologisk betydning

Vevsskade fører alltid til økt produksjon av ROS og dermed oksidativt stress (Halliwell, 1997). Mange ulike sykdommer kan settes i sammenheng med frie radikaler og oksidativt stress. Det er usikkerhet om oksidativt stress kan være en direkte årsak til sykdom eller motsatt. Det har vært foreslått at frie radikaler alene kunne ikke initiere en sykdom hos et friskt individ, men de oppstår som en konsekvens av sykdommen og medfører vevsskade (Kerr *et al.*, 1996), (Halliwell, 1997). I noen tilfeller kan oksidativt stress oppstå på et tidlig tidspunkt, for eksempel i aterosklerose, ved noen kreftformer og i kroniske inflammasjonstilstander (Halliwell, 1997).

4.2.7.1 Aterosklerose

Frie radikaler og lipidperoksidering spiller en avgjørende rolle i utviklingen av aterosklerose (Knight, 1995). Det er en sykdom i arterieveggen som er karakterisert ved en lokal fortykning av den innerste delen av blodårene (Halliwell *et al.*, 2007). Sykdommen begynner med at funksjonen til det vaskulære endotel blir svekket. Når endotelet blir skadet, vil low-density lipoprotein (LDL) og monocytter strømme til den skadete åreveggen. Monocytene utvikles til makrofager, og det produseres superoksid og hydrogenperoksid fra begge celletypene. Dermed oppstår oksidativt stress og LDL kan bli oksidert. Makrofagene har både LDL- og scavenger-reseptorer. Dersom LDL er blitt oksidert, vil det ikke bli tatt opp av LDL-reseptorer og deretter degradert. Det blir i stedet tatt opp av scavenger-reseptorer, men de blir ikke fullstendig degradert. Det skjer en opphopning av oksidert LDL i makrofagene, og etter hvert fører dette til at disse cellene omdannes til skumceller. I tillegg produseres det inflammatoriske molekyler, cytokiner og vekstfaktorer fra ulike celletyper som bidrar til dannelsen av fettstreker og aterosklerotiske plakk. Et slikt plakk kan løsne og lede til dannelse av en trombose som kan blokkere en arterie eller vene. Dette kan resultere i hjerteinfarkt eller hjerneslag (Halliwell *et al.*, 2007), (Knight, 1995), (Westhuyzen, 1997), (Rang *et al.*, 2003).

4.2.7.2 Kreft

Utviklingen av kreft kan skyldes kjemiske og inflammatoriske prosesser nært knyttet til frie radikaler. Radikalene kan skade genomet ved å skape permanente endringer i DNA-sekvensen som følge av punktmutasjoner, rearrangering av gener eller fjerning av sekvenser (Knight, 1995). Dersom DNA-skadene ikke blir rettet opp, kan det utvikles kreft (Kerr *et al.*, 1996).

Mange studier har vist at det er en sammenheng mellom kreft og et lavt inntak av antioksidanter som vitamin C og E (Knight, 1995).

4.2.7.3 Reumatoid artritt

Reumatoid artritt er karakterisert av kronisk betennelse i leddene, spesielt i hendene. I det affiserte ledd tiltrekkes det et stort antall av fagocytterende celler som produserer mye ROS (Halliwell *et al.*, 2007). Inflammatoriske prosesser i ledd kan induseres av immunkomplekser, bakterielle produkter og ulike krystaller, som så aktiverer polymorfonukleære celler. Ved reumatoid artritt er det påvist et høyt nivå av jern i synovialmembranen og synovialvæsken (Knight, 1995). Dette fører da til økte nivåer av frie radikaler. Hyaluronsyre i brusken og synovialvæsken blir degradert av oksygenderiverte radikaler. Frie radikaler kan også aktivere kollagenaser og ødelegge proteoglykaner, kollagen og elastin (Blomhoff, 2007).

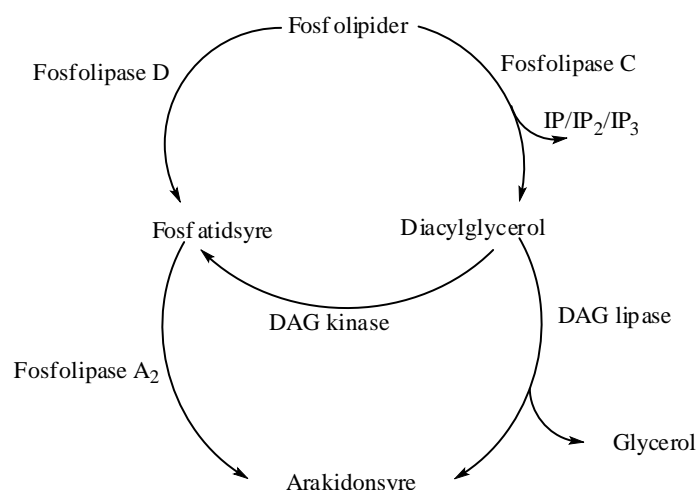
4.2.7.4 Ischemisk reperfusjon

Ischemi inntreffer når et vev får oksygenmangel. Årsaken til dette er vanligvis aterosklerose (Halliwell *et al.*, 2007). Det har vist seg at akutt ischemi gir mindre strukturelle vevskader enn ved reperfusjon av vevet (Knight, 1995). Ved mangel av ATP i hypoksiske/ ischemiske vev vil det føre til at hypoxantin akkumuleres. Enzymet xantin dehydrogenase oksiderer xantin eller hypoxantin til urinsyre. Ved ischemi vil dette enzymet omdannes til xantin oksidase. Når vevet får igjen økt blodtilførsel, blir xantin eller hypoxantin oksidert av xantin oksidase til urinsyre. I tillegg blir det også dannet O_2^- og H_2O_2 , og dette fører videre til oksidativt stress som kan gi alvorlig vevsskade (Halliwell *et al.*, 2007).

4.3 Arakidonsyremetabolisme og 15-lipoksygenase

Eikosanoider er en gruppe av mediatorer som stammer fra arakidonsyre (5Z, 8Z, 11Z, 14Z-eikosatetraensyre) og består av prostaglandiner, tromboksaner, prostasykliner, leukotriner og lipoksiner (Fernandez *et al.*, 2001). De er implisert i kontrollen av mange fysiologiske prosesser og er blant de viktigste mediatorene i inflammasjonsprosessen. Eikosanoidene finnes ikke lagret i vev, men dannes på stedet ved at arakidonsyre frigis fra fosfolipider i cellemembranen. Arakidonsyre, som er en C_{20} umettet fettsyre med fire dobbeltbindinger, blir frigitt fra membranfosfolipider enten via en ett-trinns prosess med en fosfolipase A_2 (PLA₂) eller i en to-trinns prosess med fosfolipase C (PLC) etterfulgt av diacylglycerol (DAG) lipase eller fosfolipase D (PLD) etterfulgt av PLA₂ (Figur 4.3.1). Denne frigjøringen skjer som en

reaksjon på ulike stimuli og er avhengig av celletype. Det er for eksempel trombin i blodplater, bradykinin i fibroblaster, antigen-antistoff reaksjoner i mast celler og celledskader (Rang *et al.*, 2003).



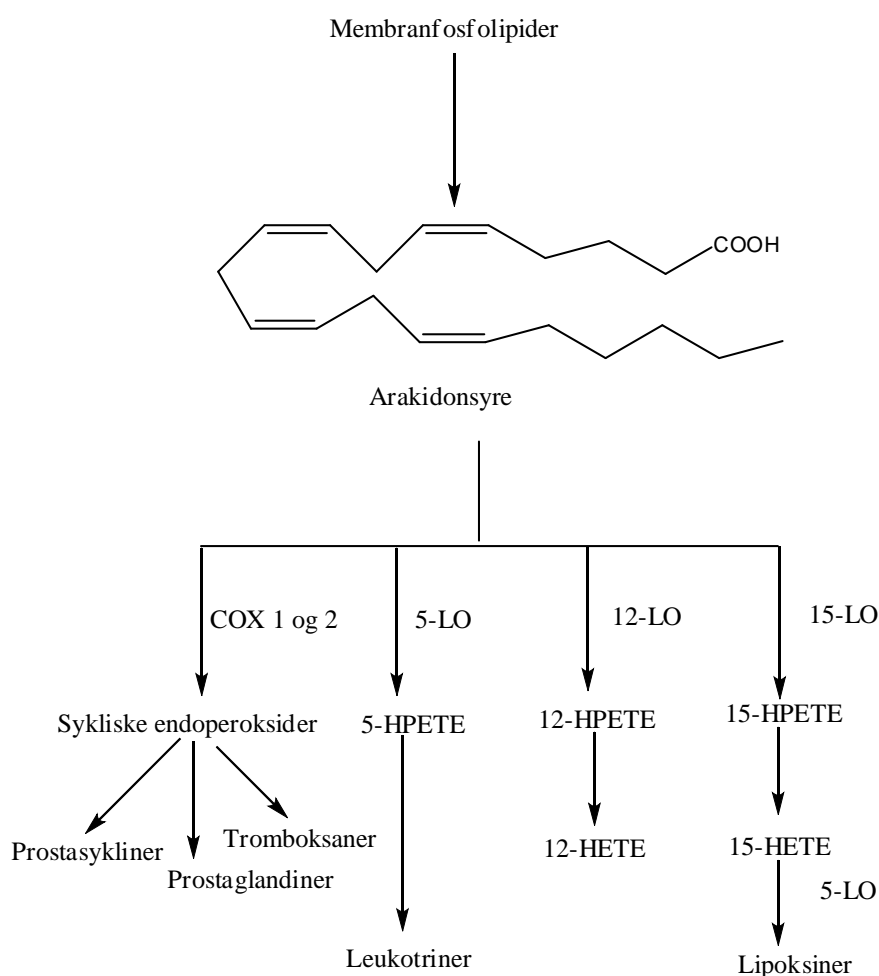
Figur 4.3.1 Frigjøring av arakidonsyre fra fosfolipider via to-trinnsprosess.

IP = inositolfosfat, DAG = diacylglycerol (Rang *et al.*, 2003)

Den frie arakidonsyren blir så omdannet videre via ulike enzymer til de forskjellige eikosanoidene (Figur 4.3.2). Cyklooksygenase-1 og -2 (COX) katalyserer dannelsen av prostacyklin, prostaglandiner og tromboksaner, mens lipoksygenaser (5-, 12- og 15-LO) katalyserer dannelse av hydroperoksyfettsyrer, som videre kan gi leukotriener og lipoksiner.

Eikosanoidene har mange ulike virkninger, avhengig av hvilke vevstyper og reseptorer de reagerer med. Prostaglandiner har effekter som vasodilatasjon (PGI₂, PGD₂), hemming av plateaggregasjon (PGI₂, PGD₂), kontraksjon eller relaksasjon av glatt muskulatur (PGE₂), hemming av magesyresekresjon (PGE₂) og økt utskillelse av slim i magesekken (PGE₂). Tromboksaner (TXA₂) gir plateaggregasjon og vasokonstriksjon. Leukotriener utløser kontraksjon av bronkial muskulatur, vasodilatasjon i de fleste kar, koronar vasokonstriksjon, kjemotakse, aktivering av monocytter, og de stimulerer proliferasjon og cytokin produksjon fra makrofager og lymfocytter. Lipoksinene er trolig involvert i inflammatoriske responser (Rang *et al.*, 2003).

Forskning har vist at 15-LO kan spille en viktig rolle i utviklingen av sykdommer som cancer, psoriasis og aterosklerose (Schneider *et al.*, 2005). 15-LO har evnen til å kunne oksidere forestrede fettsyrer i biologiske membraner og i LDL, dette er et viktig trinn i dannelsen av aterosklerotiske lesjoner. I tillegg hemmer 15-HPETE, et intermediat i produksjon av lipoksiner, syntesen av prostacyclin som fremmer vasodilatasjon og motvirker plateaggregasjon (Funk *et al.*, 2001), (Schneider *et al.*, 2005), (Lyckander *et al.*, 1996). 15-LO hemmere uten antioksidanteffekt har vist seg å kunne hemme ateroskleroseutviklingen i dyreforsøk (Sendobry *et al.*, 1997).

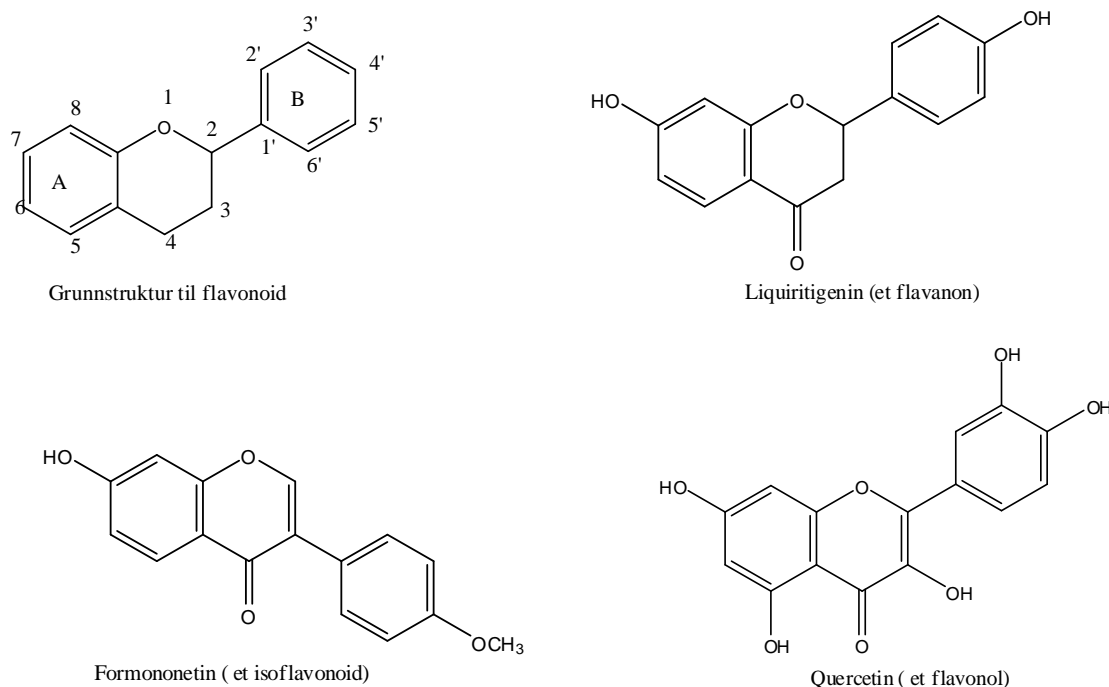


Figur 4.3.2 Arakidonsyremetabolisme. COX = cyklooksygenase, LO = lipoksygenase. HETE = Hydroksyeikosatetraensyre, HPETE = Hydroperoksyekosatetraensyre (Rang *et al.*, 2003), (Fernandez *et al.*, 2001).

4.4 Generelt om isolerte substanser

4.4.1 Flavonoider

Flavonoider er en stor, naturlig forekommende gruppe av fenoliske forbindelser. De er vidt utbredt i naturen og finnes i nesten alle høyere planter (Malterud, 1998). Deres grunnstruktur består av to aromatringer bundet sammen av en 3-karbon kjede som vanligvis går inn i en pyranring. Flavonoider inneholder mange fenoliske hydroksylgrupper, og klassifiseres inn i flere subklasser etter strukturelle variasjoner. De vanligste subklassene er flavoner, flavonoler, flavanoner, anthocyanidiner og isoflavonoider (Malterud, 1998), (Samuelsson, 1999), (Figur 4.4.1).



Figur 4.4.1 Grunnstrukturen til flavonoider og eksempler på noen subklasser (Malterud, 1998), (Andersen *et al.*, 2006), (Samuelsson, 1999).

Flavonoider har vært kjent som antioksidanter i lang tid, og de er derfor en viktig del av kostholdet ved forebygging av sykdommer. De har evne til å scavenge frie radikaler som superoksid og hydroksyl, og hindre disse i å utøve sine skadelige effekter (Heinrich *et al.*, 2004). Flavonoidene har også en rekke andre verdifulle effekter. De styrker karveggene i blodkapillærene, kan motvirke aggregasjon av blodplater og hemme 15-lipoksygenase som antas å spille en viktig rolle ved utvikling av aterosklerose. Andre interessante biologiske

aktiviteter av flavonoidene er antiinflammatorisk, antihepatotoksisk, antitumor, antimikrobiell, antiviral og østrogen effekter (Malterud, 1998), (Samuelsson, 1999).

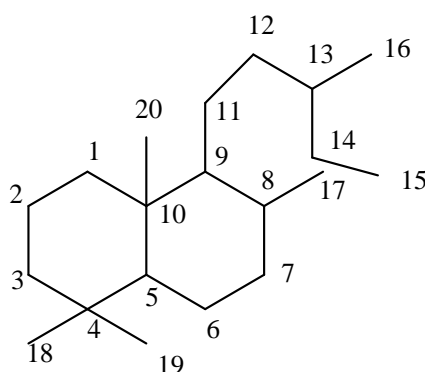
Strukturelle forhold som har betydning for scavenging og antioksidant virkningen av flavonoidene, er som følger (Paganga *et al.*, 1996), (Rice-Evans *et al.*, 1997):

- en ortho 3',4'-dihydroksy substitusjon på B-ringene (som gir det mest stabile fenoksy radikalet i forhold til elektron delokalisasjon).
- meta 5,7-dihydroksy substitusjon i A-ringene
- 2,3-dobbelbinding i kombinasjon med både 4-ketogruppe og 3-hydroksylgruppe i C-ringene (for elektron delokalisasjon) så lenge det er o-dihydroksy struktur i B-ringene
- forandringer i substitusjonsmønsteret av hydroksylgruppene og substitusjon av hydroksylgruppene ved glykosylering vil vanligvis redusere antioksidantaktiviteten

Quercetin for eksempel har alle disse strukturelle egenskapene, og er derfor en potent antioksidant (Paganga *et al.*, 1996) (Figur 4.4.1).

4.4.2 Labdan-type diterpen

Et stort antall diterpener tilhører en bisyklisk diterpengruppe som forekommer mye i naturen. Forbindelsene i denne gruppen har en C_{20} – enhet og et labdan skjelett. Dette skjelettet består av decalin ($C_{10}H_{18}$) og en sidekjede som kan være åpent eller lukket med et oksygenatom (Chinou, 2005), (Figur 4.4.2).



Figur 4.4.2 Grunnstrukturen til et labdan diterpen skjelett (Chinou, 2005)

Labdan-type diterpener har blitt funnet i sopp, insekter, marine organismer, eterisk olje og høyere planter. En rekke studier har vist at denne type diterpen har et bredt spektrum av biologiske aktiviteter. Eksempler er antimikrobielle, antituberkulose, antiinflammatoriske,

cytotoksiske og antiprotozoale aktiviteter og hemming av superoksid anion radikal frigjøring. De har også en rekke interessante aktiviteter på enzymsystemer, som for eksempel hemming av adenosin transferase, aldose reduktase, adenylat syklase enzymsystemer og fosfolipase A₂. Ut fra de nevnte biologiske aktivitetene kan labdan-type diterpener betraktes som potensielle farmakologiske substanser (Chinou, 2005).

5 Eksperimentelt

5.1 Materialer

5.1.1 Kjemikalier

<i>Oversikt over kjemikalier</i>	<i>Produsent</i>
Aceton purum	Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge
Acetonitril	Prolabo, Fontenay-sous-Bois, Frankrike
Aqua-Biosal havsaltblanding	AB-Aqua Technik Berg, Tyskland
Artemia salina egg (rekelarve egg)	DOSHE Aquaristik KG, Gelsdorf, Tyskland
Boratbuffer (0,2 M natriumborat, pH 9)	Farmasøytisk Institutt Oslo, Norge
Butanol	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ceric reagens (1% cerium (IV) sulfat i 10% vandig svovelsyre)	Farmasøytisk Institutt Oslo, Norge
d6-Aceton	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
d6-Dimetylsulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Destillert vann	Farmasøytisk Institutt Oslo, Norge
DPPH (difenylpicrylhydrazyl)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Diklormetan	Sigma-Aldrich, Seelze, Tyskland
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Tyskland
d-Kloroform (CDCl ₃)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
d-Metanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Etanol	Arcus, Oslo, Norge
Etylacetat	Sigma-Aldrich, Seelze, Tyskland
Kloroform	Sigma-Aldrich, Seelze, Tyskland
Linolsyre	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Lipoxidase type 1-B fra soyabønne, L-7395 (15-Lipoxygenase)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Metanol	Merck, Darmstadt, Tyskland
Metanol purum	Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge
N ₂ -gass	AGA, Oslo, Norge
Petroleumseter, Kp. 100-120°C	Dagenham, England
Silika gel 60 PF 254 med gips	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Tetrametylsilan (TMS)	Sigma-Aldrich, Seelze, Tyskland
Tungtvann	Sigma-Aldrich, Seelze, Tyskland

[illegible]

<i>NMR</i> Varian Gemini 200 Bruker DPX 300 Bruker AVII 600	Varian, Palo Alto, CA, USA Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Tyskland Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Tyskland
<i>Oljepumpe</i> Edwards E-Lab 2	Edwards High Vacuum International, Sussex, England
<i>Rotavapor</i> Rotavapor- R med varmebad B-480 Ilmvac 400171 vakumpumpe	Buchi, Flawil, Sveits Ilmvac, Ilmenau, Tyskland
<i>Sentrifugalt akselerert tynnsjikt-kromatografi</i> Chromatotron 7924 T TLC glassplate Flowmeter Reservoar, 250 ml	Harrison Research, Palo Alto, CA, USA
<i>Sterilfilter</i> Millex-FG 0,20 µm	Millipore, Bedford, USA
<i>Ultralydbad</i> Branson 220	Branson Ultrasonics Corp., Geneve, Sveits
<i>UV-apparat</i> UV-spektrofotometer Shimadzu UV 160A Temperaturregulator: Shimadzu CPS-controller Kyvetteholder: Shimadzu CPS-240A	Shimadzu, Kyoto, Japan
<i>UV-lampe</i> Model UVSL-58 (254 og 366 nm)	Ultra Violet Products, San Gabriel, CA, USA
<i>Varmeskap</i> Varmeovn Heraeus	Heraeus, Hahau, Tyskland
<i>Vekt</i> Sartorius model BP221S Mettler PM4800 DeltaRange	Sartorius. Göttingen, Tyskland Mettler-Toledo, Greifensee, Sveits

5.2 Metoder

5.2.1 Generelle metoder

5.2.1.1 Innveiing

Ved innveiing av stoffer ble det benyttet en analysevekt eller overskålsvekt avhengig av mengde som skal veies.

5.2.1.2 Inndamping

Etter gjennomføring av hver separasjonsmetode ble løsningsmiddelet i de ulike fraksjoner dampet inn under vakuum ved 40-60 °C på rotavapor.

5.2.1.3 Fjerning av løsemiddelrester

For å fjerne de siste løsemiddelrestene ble ekstrakter, fraksjoner og krystaller koblet til en oljevakuumpumpe i 5-30 minutter.

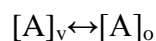
5.2.2 Separasjonsmetoder

5.2.2.1 Væske-væske ekstraksjon

Prinsipp

Væske-væske ekstraksjon er en viktig metode til å separere eller isolere stoffer fra en væske. Metoden baserer seg på stoffers fordeling mellom to ikke blandbare væsker (Greibrokk *et al.*, 2005). Den ene væsken er vanligvis en vandig løsning og den andre væsken er et organisk løsemiddel som ikke er blandbart med vann (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2004).

Når en vandig løsning med et organisk stoff A rystes med et organisk løsemiddel, vil det raskt innstille seg en likevekt (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2004). Likevektfordelingen for stoffet A kan beskrives av ligningen:



hvor v og o er henholdsvis vandig og organisk fase, og beskriver hvordan A fordeler seg mellom disse to fasene (Greibrokk *et al.*, 2005). $[A]_v$ og $[A]_o$ uttrykker konsentrasjonen av A i organisk fase og i vandig fase.

For å ekstrahere et stoff fra en vandig løsning benyttes et organisk løsningsmiddel med tilstrekkelig løsningsmiddelstyrke til å løse stoffet og med tilfredsstillende selektivitet til at

uønskede komponenter i prøven ikke blir ekstrahert med (Greibrokk *et al.*, 2005). En generell regel er at likt løser likt (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2004). Upolare stoffer ekstraheres best med upolare løsningsmidler. Øker polariteten av stoffene i en prøveløsning, må også polariteten av løsningsmidlet økes. For eksempel hvis ekstraksjonen startes først med for eksempel et upolart løsningsmiddel, vil kun de mest upolare forbindelsene ekstraheres over i den organiske fasen. Den vandige fasen kan deretter ekstraheres med et litt mer polart løsningsmiddel og dermed vil forbindelser som er litt mer polare ekstraheres over i denne fasen. Gjentatte ekstraksjoner med små volumer løsningsmiddel gir høyere utbytte enn en enkel ekstraksjon med et større løsningsmiddelvolum (Greibrokk *et al.*, 2005).

Løsninger og reagenser

Destillert vann ble benyttet til å løse opp råkstraktene. Løsningsmidler med økende polaritet ble anvendt ved ekstraksjonen, og de var som følgende: diklormetan, etylacetat og 1-butanol.

Utførelse

Ekstraksjonen ble utført i skilletrakt. Under ekstraksjonen var det viktig å sikre god rysting, slik at fasene ble blandet godt. Når fasene hadde separert seg, ble den tyngste fasen tappet ut i bunnen av skilletrakten, mens den letteste fasen ble igjen.

5.2.2.2 VersaFlash kolonneseparasjon

Prinsipp

Kromatografi er et samleavn på separasjonsmetoder som benyttes til å skille stoffer fra hverandre. Det er to faser i kromatografi: en fase som beveger seg (mobilfase), og en som står i ro (stasjonærfase) (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2004).

I kolonnekromatografi er stasjonærfasen faste partikler som er pakket i et rør (en kolonne). Kolonnen er koblet til en pumpe som pumper mobilfasen gjennom med en bestemt hastighet (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2004). I VersaFlash kolonnekolonneseparasjon benyttes det ferdigpakkede VersaPak kolonner med polar eller upolar stasjonærfase.

Prøveløsning blir applisert på kolonnen ved hjelp av en sprøyte og elueres med en passende mobilfase. Mobilfasen bringer stoffblandingen inn i kolonnen hvor de kommer i kontakt med

stasjonærfasen. Hvis stasjonærfasen bremser opp stoffene, vil de transporteres langsommere gjennom kolonnen enn det mobilfasen gjør. Når det er flere stoffer i blanding og stasjonærfasen bremser stoffene forskjellig, vil stoffene transporteres med forskjellig hastighet gjennom kolonnen. De vil komme ut av kolonnen på forskjellige tidspunkter og dermed blir separert (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2004). De ulike fraksjoner blir samlet opp etter hvert som mobilfasen kommer ut fra kolonnen.

Valg av mobilfase er avhengig av hvilke stoffer som ønskes separert og hvilken stasjonærfase man bruker. Det er vanlig å bruke en blanding av flere løsningsmidler som mobilfase, og elueringen kan foretas isokratisk eller med gradient. Analytisk TLC kan benyttes til å teste ut på forhånd hvilken mobilfase som vil separere stoffene i en prøve best ved kolonnekromatografi.

To mest brukte kolonnematerialer:

- Silika

I normalfasekromatografi er silika (silikagel) den vanligste stasjonærfasen, og mobilfasen er organiske løsningsmidler. Silika har et stort overflateareal, fordi den er et porøst materiale. Når mobilfase strømmer gjennom silika, vil den fylle opp hele volumet mellom partiklene og hele porevolumet inni partiklene. Dette gir en enorm kontaktflate til mobilfasen. Stoffmolekyler som transporteres av mobilfasen, vil eksponeres kraftig for de aktive gruppene på overflaten. På silika er det silanolgruppene (Si-OH) som er de aktive gruppene, og det er disse gruppene som gjør overflaten polar og svakt sur (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2004). Stoffe vil adsorbere til silika primært via hydrogenbinding hvor overflatehydroksylene vanligvis vil være protondonorer. På grunn av den svakt sure overflaten vil aminer og andre baser bli sterkt adsorbent, slik at disse kommer ut sist (Greibrokk *et al.*, 2005).

- C₁₈-bundet silika

I omvendt-fase-kromatografi er det C₁₈-bundet silika som har en hydrokarbonkjede med 18 karbonatomer, som er mest brukt som stasjonærfase (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2004). Som mobilfase benyttes vanligvis blandinger av vann med en organisk komponent som er fullstendig blandbar med vann. De viktigste interaksjoner som finner sted mellom stoffer i prøven og stasjonærfasen er av typen van der Waalske krefter, relativt svake krefter som

øker med molekylstørrelsen. Polare interaksjoner er av liten betydning på grunn av det vandige system som motvirker slike interaksjoner. Det er i hovedsak størrelsen på den upolare del av molekylet som har noen effekt på retensjonen. Dette medfører at de mest polare stoffene har minst retensjon og elueres ut først (Greibrokk *et al.*, 2005).



Figur 5.2.1 Bilde av VersaFlash apparat og tilhørende utstyr (Sigma-aldrich, 2008)

Løsninger og reagenser

Et løsningsmiddel ble brukt for å løse prøven, og ulike løsningsmidler ved TLC var vist å egne seg ble brukt som mobilfase. De mest brukte løsningsmidler var metanol, diklormetan, etylacetat og kloroform.

Utførelse

Kolonnen ble kondisjonert med den første mobilfasen. Prøven ble løst i et lite volum av egnet løsningsmiddel, og applisert på kolonnen. Deretter ble komponentene eluert ut ved hjelp av egnede mobilfaser, og fraksjoner med passende fraksjonsvolumer ble samlet opp. Kolonnen ble til slutt vasket med et egnet løsningsmiddel (for eksempel aceton eller metanol) for å skylle ut eventuelle rester.

5.2.2.3 Sentrifugalt akselerert tynnsiktskromatografi

Prinsipp

Prinsippet for sentrifugalt akselerert tynnsiktskromatografi (CA-TLC) er det samme som for analytisk TLC, som er beskrevet i avsnitt 5.2.3.1 Analytisk tynnsiktskromatografi. I CA-TLC er platen sirkulær og dekket med silikagel som er blandet med gips for å hindre at silikalaget sprekker. Et stoff som fluorescerer i kortbølget UV-lys er tilsatt stasjonærfasen. Platen roterer under elueringen, som foregår i en kromatotron. Dette apparatet fører til at det dannes en akselerert flyt av mobilfase på grunn av sentrifugalkraften.

Etter at platen er mettet med mobilfasen blir prøven påsatt innerst på platen gjennom et hull i lokket på kromatotronen og via en veke som går ned til platen. Mobilfasen blir deretter koblet til, og stoffer blir eluert utover plata samtidig som sentrifugalkraften vil virke inn. Når de når enden av plata slynges de ut, og kan samles opp i fraksjoner. Lokket på kromatotronen er gjennomtrengelig for UV-lys. Dersom stoffene absorberer kortbølget UV-lys eller fluorescerer i langbølget UV-lys, kan man følge med på når stoffene vil elueres ut. Utførelsen av CA-TLC foregår under en inert N₂ atmosfære, dette for å hindre oksidasjon av stoffene i prøven (Hostettmann *et al.*, 1998).

Løsninger og reagenser

Det ble brukt silikagel 60 PF₂₅₄ med gips og kaldt destillert vann til støping av TLC plate. Prøven ble løst i et lite volum av egnet løsningsmiddel og eluert med ulike løsningsmidler i blanding.

Utførelse

For å kunne bruke kromatotron må den sirkulære glassplaten støpes med et lag av silikagel først. Glassplaten med silikagel-laget ble lagt ved å blande 65,0 g silikagel 60 PF₂₅₄ med gips og 130 ml kaldt destillert vann i en erlenmeyerkolbe. Blandingen ble ristet til den var homogen og ble deretter spredt utover på glassplaten. Etter at platen hadde blitt lufttørket i en time, ble den plassert i varmeskap ved 70 °C over natten. Overflaten til glassplaten ble så skrappt jevnt til 2 mm tykkelse. Det ble også skrappt av i midten og langs ytterkanten av platen.

Før applisering av prøven ble den støpte platen kondisjonert med mobilfasen under rotering. Prøven ble løst i egnet løsningsmiddel og applisert på platen litt etter litt, mobilfasereservoaret

ble så koblet til. Fraksjoner ble samlet opp fra kromatotronen og separasjonen kunne følges visuelt ved hjelp av en UV-lampe.

5.2.2.4 Preparativ væskekromatografi

Prinsipp

Prinsippet for væskekromatografi (HPLC-High Performance Liquid Chromatography) er relativt likt som for VersaFlash kolonnekromatografi. Begge metodene baserer seg på at mobilfase som er en væske, presses gjennom en kolonne pakket med et materiale som retarderer stoffene i prøveløsningen (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2004). HPLC er forskjellig fra VersaFlash kolonnekromatografi ved at den blir utført ved et trykk på 100-300 bar, men også ved at det er koblet en detektor (vanligvis UV-detektor) til kolonnen. Det høye trykket til HPLC skyldes de fysiske egenskapene til kolonnen kombinert med høy væskeflyt, og det er derfor nødvendig med en pumpe for å drive mobilfasen gjennom (Greibrokk *et al.*, 2005).

I HPLC er kolonnen typisk 5-25 cm lange stålrør pakket med stasjonærfase (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2004). Det finnes mange ulike kolonnematerialer til bruk ved HPLC, som blant annet normalfase silika og omvendt-fase C₁₈-bundet silika. Det er det sist nevnte kolonnematerialet som er mest anvendt (Greibrokk *et al.*, 2005). Prinsippet for separasjon på en C₁₈-kolonne er beskrevet i avsnitt 5.2.2.2 VersaFlash kolonnekromatografi. HPLC kan brukes både analytisk og preparativt. Analytisk HPLC blir brukt til å finne en egnet mobilfase til preparativ kjøring, og det er kun et lite uttak av prøven som blir analysert.

Løsninger og reagenser

Prøven ble løst i et egnet løsningsmiddel med et maksimalt volum på 1 ml. Ulike blandingsforhold av egnede løsninger med HPLC-kvalitet ble brukt til eluering av prøven.

Utførelse

Før applisering av prøven ble kolonnen kondisjonert med mobilfasen i 30 minutter. Deretter ble prøven filtrert gjennom Millex filter og injisert på kolonnen ved hjelp av injeksjonsloopen. Filtringen ble utført for å fjerne eventuelt partikulært materiale som kunne tilstoppe kolonnen. Gradienteluering ble benyttet. Ved analytisk HPLC ble det brukt en analytisk HPLC kolonne som er mindre enn preparative HPLC kolonner, og et kromatogram ble tatt

opp. Ved preparativ HPLC ble også kromatogrammet tatt opp, og det ble samlet opp fraksjoner.

5.2.3 Identifikasjonsmetoder

5.2.3.1 Analytisk tynnsjikt-kromatografi (TLC)

Prinsipp

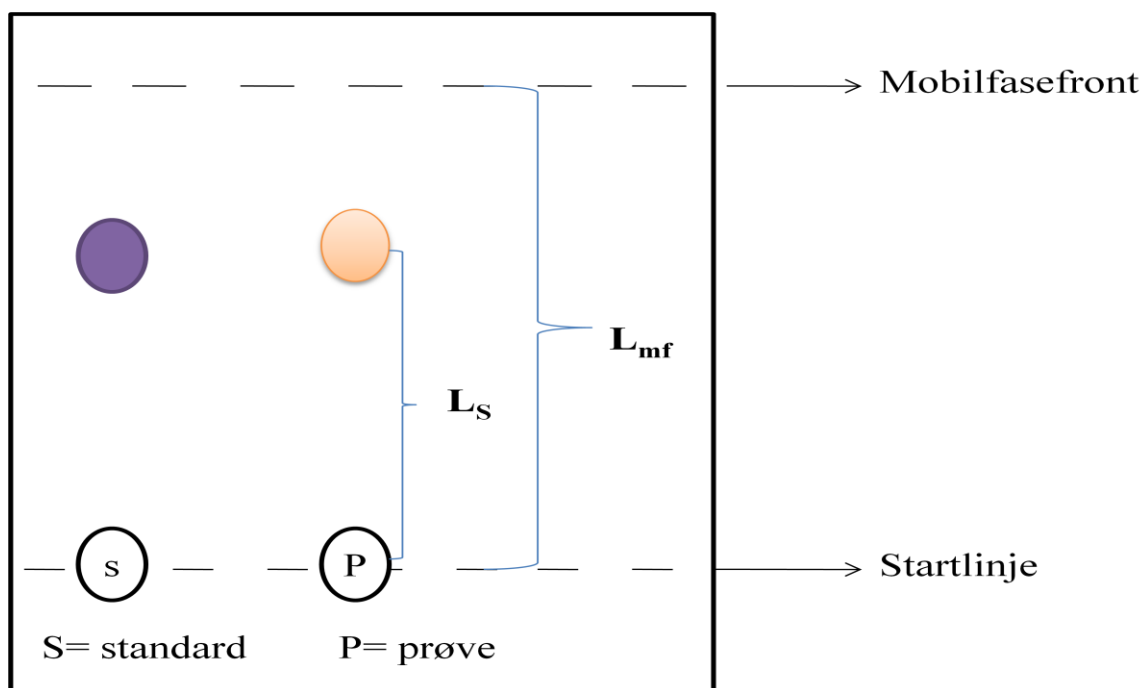
I TLC (Tynnsjikt-kromatografi, Thin Layer Chromatography) er mobilfase en væske, mens stasjonærfasen ligger som et tynt sjikt på en flat plate av glass, plast eller metall (Greibrokk *et al.*, 2005). Normalfase-kromatografi med silika som stasjonærfase og organiske løsemidler som mobilfaser er vanligst, men omvendt-fase-kromatografi med vandige mobilfaser benyttes også (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2004).

Prøver og standarder løses i et løsningsmiddel og påsettes som flekker på en linje langs den ene sidekanten av platen. Løsningsmiddelet dampes av, og platen settes med påsetningskanten ned i et kar som inneholder mobilfasen og vanligvis en mettet atmosfære av denne. Nivået av mobilfasen må være lavere enn avstanden mellom platekanten og de påsatte flekkene. Når platen kommer i kontakt med mobilfasen vil mobilfasen trekkes oppover platen ved hjelp av kapillærkrefter, og komponentene i prøvene vil bli transportert med forskjellig hastighet og bli separert. Når mobilfasen nærmer seg øvre platekant, tas platen ut av karet og mobilfasen avdampes. Deretter kan komponentene detekteres enten visuelt eller instrumentelt. Platen kan også fremkalles med ulike sprayreagenser, for eksempel med ceric reagens (Greibrokk *et al.*, 2005).

Vandringen til et stoff beskrives med stoffets retensjonsfaktor (R_f -verdi), som kan defineres som følgende:

$$R_f = L_s / L_{mf}$$

hvor L_s er stoffets vandringsavstand fra startsonens senter (startlinjen) til flekkens senterpunkt, og L_{mf} er avstanden fra startlinjen til mobilfasefronten (Greibrokk *et al.*, 2005), se figur 5.2.2.



Figur 5.2.2 Påsetting av prøve og standarder på TLC plate, samt beregning av R_f

Løsninger og reagenser

Løsningsmidler ble brukt for å løse prøvene og blandinger av løsningsmidler ble brukt for å utvikle platene.

Utførelse

Den ønskede mobilfase ble overført til et utviklingskar. Karet (med lokk) ble satt i avtrekkskapet i ca. 15 minutter slik at atmosfæren i karet ble mettet med mobilfasen. Deretter ble 10 μ l av prøveløsningene satt på TLC-platene med mikropipetter langs en startlinje ca 2 cm fra kanten. Avstanden mellom påsettingene skal være minst 1 cm. Etter at løsningsmidlene til prøvene hadde dampet av, ble TLC-platene satt i karet for utvikling. Platene ble tatt av før mobilfasen nådde toppen av platen, og mobilfasefronten ble avmerket. Etter kromatograferingen ble mobilfasen fordampet og komponentene ble påvist ved at platen ble bestrålt med UV-lys ved 254 nm (kortbølget) og 366 nm (langbølget). Til slutt ble platene sprayet med DPPH- eller Ceric-reagens.

5.2.3.2 Ceric-spraying

Prinsipp

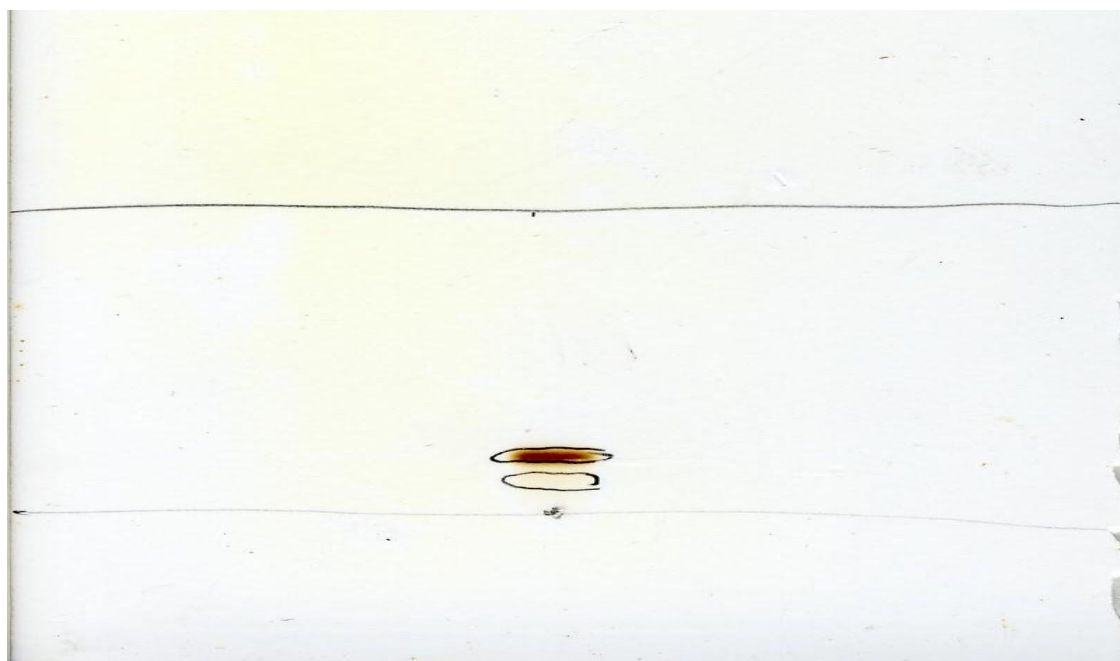
Ceric reagens, som inneholder svovelsyre og cerium(IV)sulfat, vil danne fargede dekomponeringsprodukter ved reaksjon med organiske forbindelser (Greibrokk *et al.*, 2005), se Figur 5.2.3. Metoden brukes til å avgjøre hvilke fraksjoner som skulle slås sammen etter fraksjonering ved VersaFlash kolonnekromagrafi og på kromatotron.

Løsninger og reagenser

Cerium(IV)sulfat 1 %, løst i 10 % vandig svovelsyre.

Utførelse

Ferdig utviklete og tørkede TLC plater ble først betraktet i kort- og langbølget UV-lys, deretter ble de sprayet med ceric reagens og lagt i varmeskap i 10 minutter ved 100 °C. Resultatet ble til slutt avlest visuelt.



Figur 5.2.3 Eksempel på en tynnsjiksplate sprayet med Ceric-reagens. Den brune flekken indikerer at stoffet har reagert med Ceric-reagens.

5.2.3.3 DPPH-spraying

Prinsipp

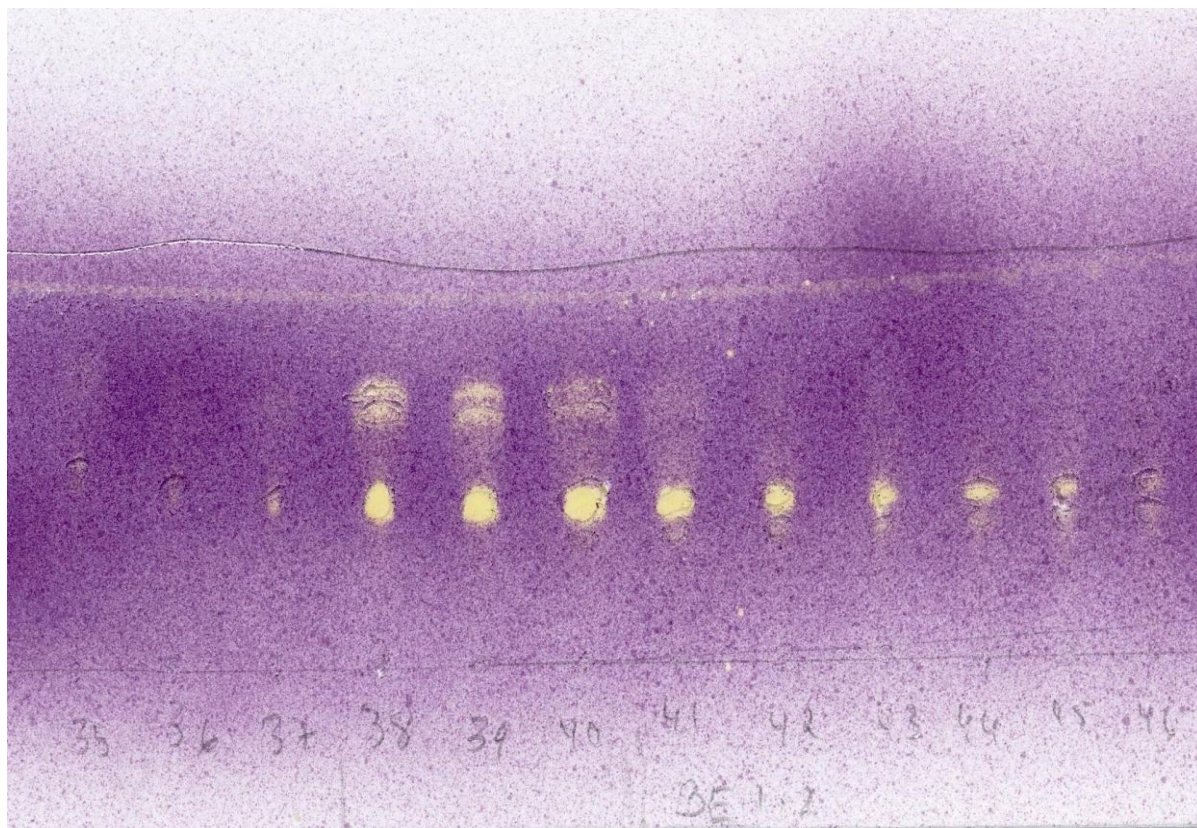
Prinsippet for DPPH-spraying er det samme som for DPPH-testen, se avsnitt 5.2.4.1 DPPH-scavenging. Stoffer som er applisert på TLC plater, vil kunne danne gule flekker mot lilla bakgrunn dersom de har radikalfangende egenskaper. Dette kan detekteres visuelt, se Figur 5.2.4.

Løsninger og reagenser

DPPH-pulver ble løst i metanol som gir en så konsentrert løsning at TLC platen farges jevnt lilla.

Utførelse

Ferdig utviklet og tørket TLC plater ble først betraktet i kort- og langbølget UV-lys, deretter ble de sprayet med DPPH-løsning. Resultatet ble avlest visuelt etter noen få minutter.



Figur 5.2.4 Eksempel på en tynnsjiksplate sprayet med DPPH-reagens. De gule flekkene indikerer radikalfangende stoff.

5.2.3.4 NMR-spektroskopi

Prinsipp

NMR-spektroskopi (Nuclear Magnetic Resonance) eller kjernemagnetisk resonans er en viktig metode for å bestemme strukturen til en forbindelse ved å identifisere ^1H - og ^{13}C -kjerener. Metoden er rask og forbruker ikke stoff.

Kjerener av hydrogen (^1H), karbon-13 (^{13}C) og andre isotoper som er NMR-aktive (har spinnkvantetall ulik 0) oppfører seg som de var små magneter og spinner rundt sin egen akse (Solomons *et al.*, 2004). Ved fravær av et ytre magnetfelt vil de magnetiske kjernene ha tilfeldig spinn. Dersom de blir plassert mellom polene til en magnet, vil de få en bestemt orientering. ^1H - og ^{13}C -kjernen kan orientere seg slik at dens eget magnetfelt er enten parallelt eller antiparallelt med det ytre magnetfeltet. Den parallelle orienteringen krever mindre energi enn den antiparallelle, derfor favoriseres de fleste kjerner denne orienteringen. Dersom de parallelt orienterte kjernene blir bestrålt med elektromagnetisk stråling med korrekt frekvens, tar de opp energi og vil flippe over fra det lavere energinivået til det høyere. Den magnetiske kjernen sies å være i resonans med den påførte strålingen når dette forekommer, og derav navnet kjernemagnetisk resonans (McMurry, 2000).

Den eksakte frekvensen som er nødvendig for resonans er avhengig av styrken på magnetfeltet og kjernens identitet. Absorpsjonsfrekvensen er ikke like for alle ^1H - eller ^{13}C -kjerener. Alle kjerner i molekyler er omringet av elektroner. Når et molekyl blir påført et ytre magnetisk felt ($B_{\text{påført}}$), vil elektronene danne små lokale magnetfelter som motvirke det ytre magnetiske feltet. På denne måten blir det magnetiske feltet som påvirker kjernen (B_{effektiv}) noe mindre. Det effektive magnetfeltet på hver kerne blir som følgende:

$$B_{\text{effektiv}} = B_{\text{påført}} - B_{\text{lokalt}}$$

Denne effekten kalles å skjerme kjernen fra full effekt av det påførte magnetfeltet. Hver spesifikk kerne i et molekyl er i forskjellige elektronmiljø, og vil bli påvirket av ulike lokale magnetfelter. Dette blir detektert av NMR-instrumentet og gir opphav til varierende signaler for alle kjerner (McMurry, 2000).

I et NMR-spektrum vises påført feltstyrke økende fra venstre til høyre. Posisjonen i spekteret hvor en kerne gir et signal kalles kjemisk skift (δ), og har enheten parts per million (ppm). Signalet ved δ er lik 0 korresponderer til en standard som kalles tetrametylsilan (TMS), og

denne brukes til å kalibrere kjemisk skift-skalaen. De kjerner som gir signaler til venstre i spekteret, er mindre skjermet (deskjermet) enn de til høyre og dermed får en høyere ppm-verdi (δ -verdi). Det motsatte gjelder for signaler til høyre i spekteret. Eksempler på kjerner som blir deskjermet er slike som påvirkes av elektronegative substituenten, samt olefiniske og aromatiske karboner og protoner. Som oftest vil alifatiske karboner og protoner bli skjermet (Solomons *et al.*, 2004).

Et ^1H -spektrum har signaler i området $\delta=0-15$ ppm og det gir forskjellige typer informasjon som er nyttige å bruke ved tolkning av spekteret. Disse er som følgende:

- Integreringskurve

Arealet til et signal i spekteret er proporsjonalt med antall protoner som gir opphav til signalet. Dersom man måler høyden på integralkurven av signalene, kan forholdet mellom antall protoner i hvert signal bli bestemt (Solomons *et al.*, 2004),(McMurry, 2000).

- Signal splitting

Signalet fra et gitt proton vil bli splittet av effekten fra det magnetiske feltet til protoner om er på nabokarbonet. Signal splitting skjer kun når de to sett av protoner har ulike kjemiske skift-verdier. Karakteristiske topper som for eksempel singlet og dublett oppstår som resultat fra splittingen. Antallet topper (multiplisiteten) er relatert til antall protoner på nabokarbonet (Solomons *et al.*, 2004). Signalet til et proton som har n identiske naboprotoner blir splittet i en multiplett med $n+1$ topper. Kjemisk ekvivalente protoner gir ikke signal splitting (McMurry, 2000).

- Koplingskonstant (J)

Avstanden mellom toppene i en multiplett kalles koplingskonstant, J . Denne måles i Hz og ligger i området 0-18. Koplingskonstanten gir informasjon om hvilke protoner som påvirker hverandre og ligger i nabostilling (McMurry, 2000).

Et ^{13}C -spektrum gir signaler i området $\delta=0-220$ ppm, og det består av kun et signal for hvert unike karbonatom. Spekteret gir opplysning om antallet av forskjellig karbonatomer i et molekyl (McMurry, 2000),(Solomons *et al.*, 2004).

Det finnes både 1-dimensjonelle (1-D) og 2-dimensjonelle (2-D) NMR spektroskopiske metoder. Eksempler på 1-D NMR spektroskopi er ^1H , ^{13}C og APT. Eksempler på 2-D NMR spektroskopi er COSY, NOESY, HMBC og HSQC.

APT (Attached proton test) blir brukt til å bestemme CH multiplisiteten (Breitmaier, 2002). I dette spekteret vil primære og tertiære karbonatomer gi positive signaler (peker oppover), mens sekundære og kvaternære karbonatomer vil gi negative signaler (peker nedover) (Hedding, 2007).

COSY (Correlated spectroscopy) er en proton-proton korrelasjonsspektroskopi. Den gir informasjon om hvordan de ulike protonene er koplet med hverandre i et molekyl. Signalene til protonene er merket langs to akser, x og y. Dette gir en speilbildeeffekt langs et diagonalt mønster. Når to protoner er koblet med hverandre, vil dette gi et signal langs x- og y-aksen som er vinkelrett på signalene til de to protonene (Solomons *et al.*, 2004), (Hedding, 2007).

NOESY (Nuclear Overhauser Effect spectroscopy) brukes til å identifisere par av spinn som gjennomgår kryss-avkobling. Den gir informasjon om hvilke kjerner som er nærmest i rommet (Universitetet i Oslo, 2007).

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) viser bindingsmønsteret mellom C og H som ligger en bindingsavstand fra hverandre. Metoden baserer seg på ^1H -og ^{13}C - NMR-spekteret og gir informasjon om krysskoblinger mellom C og H. De to nevnte spektre ligger på hver sin akse. Signaler for C og H som er bundet til hverandre møtes vises i spektrumet (Breitmaier, 2002), (Hedding, 2007).

HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) gir informasjon om bindingsmønsteret i et molekyl. Metoden baserer seg også på ^1H -og ^{13}C - NMR-spekteret og viser koblinger mellom C og H som ligger 2 og 3 bindingsavstander fra hverandre (Hedding, 2007).

Løsninger og reagenser

Prøvene ble løst i deutererte løsningsmidler, eksempelvis deuterert aceton, kloroform, metanol og tungtvann. Tetrametylsilan ble brukt som referansesubstans.

Utførelse

En mengde (vanligvis 10-50 mg) av prøven ble løst i et egnet deuterert løsningsmiddel på ca 0,8 ml. Det deutererte løsningsmiddelet var tilsatt omtrent 1 % TMS på forhånd. Ferdig oppløste prøver ble overført til et NMR-rør, og deretter analysert på NMR-spektrometeret.

5.2.3.5 UV-spektroskopi

Prinsipp (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2004)

I UV-spektroskopi benyttes elektromagnetisk stråling i bølglengdeområdet 200 nm til 400 nm. Dersom det sendes elektromagnetisk stråling mot molekyler i løsning, vil man observere at intensiteten til strålingen svekkes ved passasje gjennom prøveløsningen. Når strålingen svekkes, vil dette bety at molekylerne absorberer elektromagnetisk stråling. Absorpsjonen er avhengig av bølglengden til strålingen. Dette skyldes at energien til strålingen varierer med bølglengden.

Når molekyler absorberer elektromagnetisk stråling, tar de kortvarig opp energi fra strålingen, og det dannes et eksitert molekyl med høyere energi. Den energien som blir tatt opp, kan bevirke følgende i molekylerne:

- overføre et elektron til en orbital med høyere energi
- øke vibrasjonene i molekylet
- øke bindingsrotasjonene i molekylet

Et bestemt molekyl vil ha et stort antall mulige kombinasjoner av disse. Hver kombinasjon tilsvarer en helt bestemt energimengde, og vil da absorbere lys ved en bestemt bølglengde. Spektre av molekyler består i prinsippet av et stort antall forskjellige absorpsjonslinjer som ligger meget tett inntil hverandre, og dette gir et kontinuerlig spektrum. I UV-spektrum blir absorpsjonen til stoffet registrert som funksjon av bølglengden. Ulike stoffer har ulike UV-spektre. Det kan derfor være mulig å si noe om hvilke bindinger og kjemiske grupper et molekyl har, ut i fra hvor i spekteret det absorberer stråling.

Ved valg av løsningsmiddel er det viktig å velge et som ikke absorberer lys i bølglengdeområdet som skal benyttes til absorpsjonsmålingene. Det er også avgjørende at løsningsmiddelet løser analytten fullstendig opp. Dette for å unngå faststoffpartikler som kunne gi spredning av UV-stråling.

Løsninger og reagenser

Et egnet løsningsmiddel ble brukt både som blindprøve og til å løse opp prøven.

Utførelse

Prøvene som skulle testes ble løst i metanol i ønsket konsentrasjon. Spektrofotometeret ble innstilt ved bølgelengdeområdet 200-400 nm og det ble nullstilt med en blindprøve bestående av 3 ml metanol. Prøven bestod av 2,95 ml metanol og 0,05ml prøveløsning. Etter omrøring ble prøven plassert i prøveholderen og registreringen av absorbans startet umiddelbart. Det ble benyttet kvartskyvetter. For fraksjoner RO11.2-11.3 ble kloroform benyttet både som blindprøve og løsningsmiddel.

5.2.3.6 Massespektrometri (MS)

Prinsipp (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2004)

Massespektrometri (MS) er en metode som benyttes både til kvantitative bestemmelser og til identifikasjon. I tillegg kan MS gi viktig strukturinformasjon om et stoff, og ved tolkning av massespektret til stoffet kan en få følgende informasjon om:

- molekylvekten til stoffet
- hvilke atomer som finnes i forbindelsen
- bruttoformel
- hvilke grupper stoffet består av

MS utføres ved hjelp av et massespektrometer som består av en ionekilde, en analysator og en detektor. I ionekilden blir forbindelsen som ønskes analysert, bombardert med elektroner i vakuum. Dette fører i første omgang til at noen av molekylene ioniseres enten til positive (molekylene mister et elektron) eller negative ioner (molekylene tar opp et elektron). Disse ionene kalles molekyllioner. Massen til molekyllionene tilsvarer massen til de opprinnelige molekylene fordi vekten til elektronene som enten er mistet eller tilført, er forsvinnende liten. I noen tilfeller er molekyllionene ustabile, og vil meget raskt spaltes opp i mindre fragmenter ved at bindinger i molekylene brytes. Dette kalles fragmentering. Noen av fragmentene vil fortsatt være ioniserte, mens andre mister sin ladning.

Massen (M) til molekyllioner og til de av molekyllfragmentene som fortsatt er ladet, bestemmes ved at ionene akseleres ut av ionekilden og inn i en masseanalysator. I denne separeres ionene etter forholdet mellom masse (m) og ladning (z) enten i et magnetisk eller elektrostatisk felt. Ioner med lite masse i forhold til ladning vil bøyes av kraftig, mens ioner med mye masse i forhold til ladning vil bøyes av i noe mindre grad. Ionene detekteres etter

analysatoren ved hjelp av en detektor, som registrerer mengden av ioner som dannes og hvilke masser disse har. Hvis relativ intensitet av ioner plottes (som stolpediagram) som funksjon av m/z , får man et massespektrum.

Nøyaktigheten til molekylmassen som angis i massespektra er avhengig av oppløseligheten til det benyttede instrumentet. Nøyaktige masser med 3-4 desimaler oppnås ved bruk av massespektrometer med høy oppløsning. Massespektrometer med lav oppløsning gir nominelle masser.

Ved tolkning av massespektre er viktig å huske på at MS differensierer mellom ulike masser for isotoper. Isotoper med forskjellig masse vil gi to toppe i massespektret. Karbon for eksempel forekommer både som ^{12}C -isotop med masse 12 og ^{13}C -isotop med masse 13. Isotopforhold er av stor betydning i forbindelse med tolkning av ukjente spektre og kan gi betydelig strukturinformasjon.

Det finnes mange ioniseringsteknikker i massespektrometri. To vanlige teknikker er elektronionisasjon og kjemisk ionisasjon. Ved elektronionisasjon (EI) foregår ioniseringen under vakuum ved at analytten føres inn i en stråle med elektroner som kommer fra en liten tråd (filament) av rhenium eller wolfram. Elektronene akseleres i et elektrisk felt med et potensial på 70 V, elektronene får da en energi på 70 eV. Det vil i noen tilfeller rives løs et elektron i molekylet som følge av elektrisk frastøtning når analytten føres inn i elektronstrålen. Dette gjør at molekylet får en positiv ladning og kalles for molekylion. De fleste molekylioner som dannes ved elektronionisasjon (EI) er relativt ustabile og vil raskt fragmentere og danne fragmentioner. Dersom alle molekylionene fragmenterer videre og danner fragmentioner, vil ikke molekylionet finnes i det tilhørende massespektrum. Det vil da ikke være mulig å avlese molekylvekten for analytten. I slike tilfeller bør kjemisk ionisasjon benyttes. Denne ioniseringsteknikken har mindre energi enn elektronionisasjon. Ved kjemisk ionisasjon innføres en reagensgass i ionekilden relativt store mengder i forhold til stoffprøven og elektronene som frigis av rhenium eller wolframtråden i ionekilden, vil nesten utelukkende ionisere reagensgassen. Reagensgassionene som dannes vil deretter ionisere molekylene i stoffprøven. Dette kan skje enten ved protonoverføring, dette gir massen $M+1$, eller ved hydridoverføring som gir massen $M-1$. Ved kjemisk ionisasjon med metan som reagensgass dannes det ioner som er relativt stabile og vil være intense i massespektrene.

Ved massespektroskopi blir prøver som er rene innført direkte i spektrometeret, mens urene prøver blir først separert enten ved gasskromatografi (GC-MS) eller væskechromatografi (LC-MS). Stoffene i prøven blir da separert ved passasje gjennom en kromatografisk kolonne, hvorefter de hver for seg eluerer inn i massespektrometeret og ioniseres eller fragmenteres.

Ioniseringsmetodene som benyttes er vanligvis enten elektrosprayionisasjon (ESI) eller atmosfæretrykk-kjemisk-ionisasjon (APCI). I ESI foregår ioniseringen under atmosfæretrykk. Når ESI benyttes, føres prøven inn i massespektrometeret i en væskestrøm, hvor væsken er forholdsvis flyktig. Denne vil etter hvert fordampe og spyles ut av massespektrometeret ved hjelp av en gasstrøm typisk av nitrogen. Analyttmolekylene vil beholde ladningen, og disse dyttes videre inn i masseanalysatoren ved hjelp av elektrisk spenning. I masseanalysatoren blir massen bestemt på samme måte som under EI. Ved APCI blir prøven også innført i massespektrometeret i en væskestrøm, og ioniseringen utføres ved atmosfæretrykk. Væskestrømmen med prøvekomponentene passerer gjennom et oppvarmet kapillærrør, og ved utløpet av dette vil væsken fordampe og transportes bort av en tørkegass. En nål pålagt et høyt elektrisk potensial (flere kV) sørger for at nitrogen og små mengder H₂O som finnes ved utløpet av kapillæret, blir ionisert. Det dannes H₃O⁺ og OH[•] (OH-radikal) som deretter reagerer med analyttene og gir protonerte molekyler eller deprotonerte molekyler. Disse molekylene innføres så i massespektrometeret og massene bestemmes. Både ESI og APCI er myke ioniseringsteknikker, og det dannes i hovedsak molekylioner.

Løsninger og reagenser

Prøven ble løst i acetonitril med et maksimalt volum på 1 ml. Ulike blandingsforhold av metanol-vann med HPLC-kvalitet ble brukt som mobilfase for HPLC ved gjennomføring av LC-MS analyse.

Utførelse

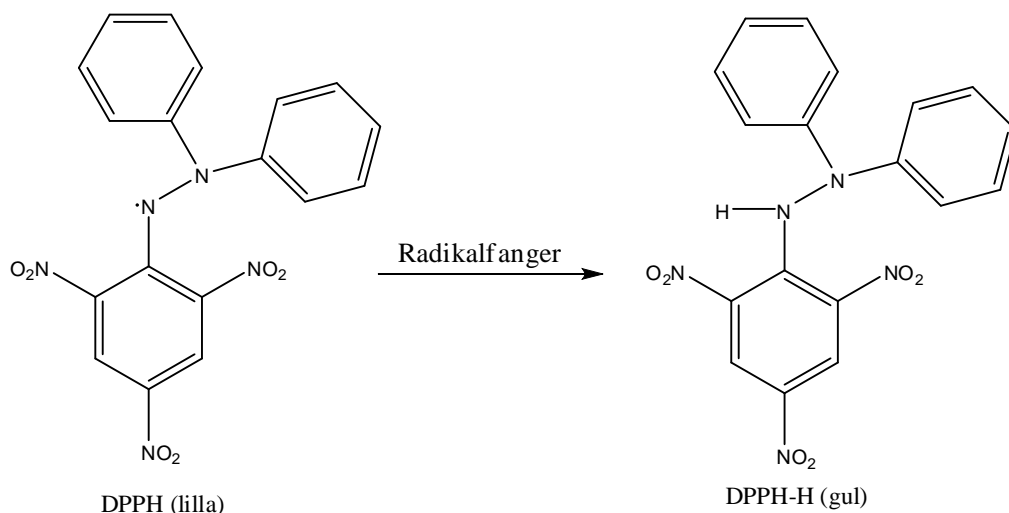
Massespektrometrisk analyse av de kjente isolerte forbindelsene ble utført på et LC-MS apparat. Prøven ble eluert på en omvendtfase analytisk HPLC kolonne med metanol-vann som mobilfase før innføring direkte fra HPLC kolonnen til MS.

5.2.4 Metoder for måling av biologisk aktivitet

5.2.4.1 DPPH-scavenging

Prinsipp

DPPH-scavenging er en metode som brukes til å bestemme antioksidantaktiviteten til en forbindelse. 1,1-Difenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) er et ganske stabilt fritt radikal. På grunn av sitt uparrede elektron har DPPH et sterkt absorpsjonsbånd ved 517 nm og i løsning gir dette radikalet en dyp lilla farge (Blois, 1958), (Malterud *et al.*, 1993). Når DPPH-radikalet reagerer med en radikalscavenger vil fargen til løsningen forandre seg fra lilla til gul, og absorpsjonen ved 517 nm vil reduseres (Glavind, 1963), (Malterud *et al.*, 1993), se Figur 5.2.5. Nedgangen i absorpsjon skyldes dannelse av 1,1-difenyl-2-picrylhydrazin (DPPH-H) som har lav absorpsjon ved 517 nm (Glavind, 1963).



Figur 5.2.5 *Reaksjon mellom DPPH og en radikalfanger* (Molyneux, 2004)

Forbindelser som har en radikalscavengeraktivitet, kan dermed måles ved å måle nedgangen i absorpsjon over et gitt tidsrom. Reduksjon i absorpsjon er relatert til mengde og aktivitet av radikalscavenger (Blois, 1958), (Malterud *et al.*, 1993). Radikalscavengeraktiviteten kan også detekteres visuelt, da DPPH-løsningen forandres fra lilla til gul. Prosent DPPH-scavenging kan beregnes ved følgende formel:

$$100 \times (\text{Astart} \times (29,5/30) - \text{Aslutt}) / (\text{Astart} \times (29,5/30)),$$

hvor Astart = Absorpsjon av DPPH-løsningen før tilsetning av prøve,

$(29,5 / 30) =$ faktoren som skyldes fortynning av DPPH løsningen etter tilsetning av 50 μ l prøveløsning til en 2,95 ml DPPH løsning.

Aslutt = Absorbans i løsningen etter 5 minutter (Universitetet i Oslo, 2007), (Malterud *et al.*, 1993).

Løsninger og reagenser

Alle prøver ble løst i DMSO. Metanol ble brukt både som løsningsmiddel for DPPH og som blindprøve.

Utførelse

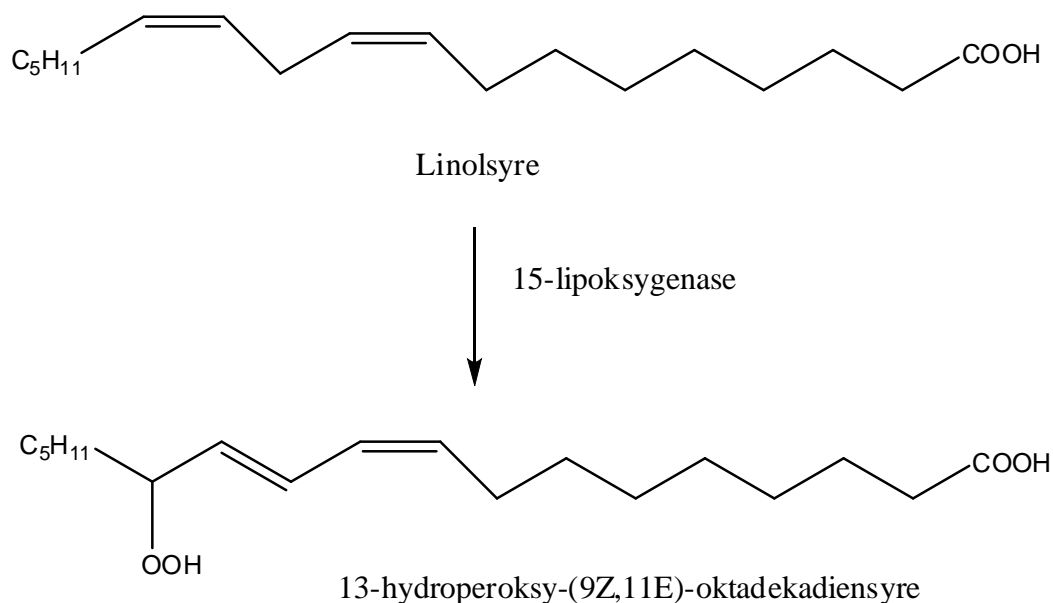
Spektrofotometeret ble nullstilt med en blindprøve bestående av metanol. DPPH-løsning ble laget ved å løse 1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl i metanol med en konsentrasjon som gir en absorbans på ca. 1,00 ved 517 nm. Absorbansen ble målt i 2,95 ml DPPH-løsning før tilsetning av prøve ved 517 nm. 50 μ l av prøveløsning ble så tilsatt, deretter ble løsningen omrørt med plastspatel. 30 sekunder etter tilsetning av prøve startet registreringen av absorbansen, og den ble målt hvert 60. sekund. Det ble utført 6 målinger i totalt 5 minutter. Det ble utført tre paralleller for hver prøve. Testen ble utført i kvartskyvetter.

5.2.4.2 15-lipoksygenasehemming

Prinsipp

Lipoksygenaser er enzymer i arakidonsyremetabolismen som katalyserer peroksidering av flerumettede fettsyrer (Malterud, 2003). Hemming av 15-lipoksydase er av stor interesse, fordi enzymet inngår i LDL-oksidering. Denne oksideringen er en prosess som antas å være viktig i forbindelse med utvikling av aterosklerose (Lyckander *et al.*, 1996).

Metoden er basert på den 15-LO katalyserte reaksjonen mellom oksygen og den flerumettede fettsyren linolsyre som har en 1,4-dien struktur, se Figur 5.2.6. Både arakidonsyre og linolsyre kan brukes som substrat for 15-LO, og de gir nokså like verdier for enzymhemming. Linolsyre er mest brukt, fordi den er billigere og mer stabil enn arakidonsyre. Enzymet som er brukt i testen er 15-LO fra soyabønner. Dette er ikke identisk med mammalsk 15-LO, men det er forholdsvis god korrelasjon mellom inhiberingsverdiene til de to enzymene (Malterud, 2003).



Figur 5.2.6 Peroksidering av linolsyre (Funk et al., 2001)

Når linolsyren blir oksidert av 15-LO, danner det en konjugert dobbeltbinding som absorberer UV lys ved 234 nm (Malterud *et al.*, 1993), (Malterud, 2003). Absorbansen økes proporsjonalt med konsentrasjonen av dannet dien. Ved hemming av 15-LO vil økningen i absorbansen bli mindre. Prosentvis enzymhemming kan beregnes etter følgende formel:

$$100 \times (A_b - A_h) / A_b$$

hvor A_b = beregnet enzymaktivitet (absorbansøkning per tidsenhet) uten hemmer

A_h = enzymaktivitet med hemmer

Løsninger og reagenser

- A: Boratbuffer; 0,2 M, pH = 9.00, ble laget av borsyre og natriumhydroksid.
- B: Stamløsning av substrat; ble laget ved å blande 50 μ l linolsyre og 150 μ l etanol, deretter ble A tilsatt til 50 ml.
- B1: Bruksferdig substratløsning; ble laget rett før bruk og bestod av 15 ml B og 225 ml A.
- C: Enzymløsning ble laget ved å løse 15-LO i A og hadde en enzymskonsentrasjon på ca. 10 000 enheter/ml. Løsningen ble laget rett før bruk og ble oppbevart på is under hele forsøket.

Utførelse

Kvartskyvetter ble benyttet under forsøket fordi disse kunne slippe igjennom UV-stråling ved 234 nm. Prøvene ble løst i DMSO. Forsøket ble utført ved romtemperatur, unntatt løsning C som ble oppbevart på is. Spektrofotometeret ble nullstilt med en blindprøve bestående av; 0,95 ml A, 2,00 ml B1 og 0,05 ml DMSO. Løsningen ble blandet godt ved omrøring med plastspatel. For å sjekke om enzymaktiviteten holdt seg stabil gjennom forsøket ble det tatt blankprøver før forsøket, etter hver tredje måleserie og tilslutt. Blankprøvene bestod av; 0,90 ml A, 2,00 ml B1 og 0,05 ml DMSO. Etter omrøring ble det tilsatt 0,05 ml C, med påfølgende omrøring. Testløsning bestod av; 0,90 ml A, 2,00 ml B1 og 0,05 ml prøveløsning. Etter omrøring ble det tilsatt 0,05 ml C, med påfølgende omrøring. Både for blankprøvene og testløsningene ble absorbansøkningen målt i perioden 30-90 sekunder etter tilsetning av C. Tre paralleller ble utført for hver prøve.

5.2.4.3 Toksisitetstest (Brine shrimp lethality assay)

Prinsipp

Mange bioaktive forbindelser er toksiske i høye doser (McLaughlin *et al.*, 1998). En in vivo test på brine shrimps (rekelarve) letalitet er mye brukt ved isolering av bioaktive naturstoffer. Den gir en god indikasjon på toksisiteten til en komponent. Det er mange fordeler ved testen. Den er enkel og rask å utføre, og det trengs ikke spesielt utstyr. I tillegg er rekelarveegg, *Artemia salina*, billig og lett tilgjengelig (Meyer *et al.*, 1982), (McLaughlin *et al.*, 1998). Forskning har vist at rekelarvetesten gir en positiv korrelasjon med cytotoxikisiteten mot noen tumor cellelinjer (Wangenstein *et al.*, 2007), (McLaughlin *et al.*, 1998). Av denne grunn er testen meget interessant.

Testen utføres ved å blande nyklekkede rekelarver med prøveløsning i et reagensrør med saltvann som er rekelarvenes naturlige miljø. Prøvene blir testet i konsentrasjoner 10, 100 og 1000 µg/ml. Antall overlevende rekelarver blir telt etter 24 timer (McLaughlin *et al.*, 1998). Ut fra testen kan LC_{50} verdien til en forbindelse eller et ekstrakt regnes ut. LC_{50} er konsentrasjonen som gir 50 % dødelighet.

Løsninger og reagenser

Rekelarveegg

Saltvann: 16,5 g Aqua-Biosal, kunstig havsaltblanding, løses i 500 ml destillert vann

DMSO

Utførelse

Saltvann ble laget ved å løse 16,5 g kunstig havsaltblanding i 500 ml destillert vann. En teskje av rekellarveegg ble lagt i en beholder med 400 ml saltvann for utklekking i 48 timer ved romtemperatur. Den benyttede beholderen var delt i to, hvor den ene delen var beskyttet mot lys og den andre var lysutsatt, se Figur 5.2.7. Ferdig klekkede rekellarver beveget seg til den lysutsatte delen av beholderen på grunn av lystiltrekning. Prøvene som skulle bli testet, ble løst i DMSO. Totalvolumet av DMSO i hver testløsning kan ikke overstige 50 μl , ved tilsetning av større volum vil resultatet bli påvirket. Det ble utført tre paralleller for hver konsentrasjon.

Testen ble utført ved å blande 50 μl av prøveløsning med 4,5 ml saltvann i et reagensrør, deretter ble 10 rekellarver tilsatt og tilslutt ble saltvann tilsatt til 5 ml. Etter at reagensrørene hadde stått i 24 timer under lys ved romtemperatur, ble antall overlevende rekellarver i hvert reagensrør talt. DMSO ble brukt som negativ prøve.



Figur 5.2.7 *Klekking av rekellarver i saltvann*

5.3 Praktisk utførelse

5.3.1 Plantemateriale

Anvendte droger var overjordiske (blomster, blader og stengler) og underjordiske (røtter) deler fra *S. canadensis*, og de ble sanket av professor Karl Egil Malterud. Den overjordiske delen ble sanket i Gaustadbekkdalen i Oslo den 3. august 2006 og skilt i stengler, blad og blomst. Etter sankingen ble de veid og fryst. Den underjordiske delen ble innsamlet på Øvre Sogn i Oslo, den 21. august 2007. Herbarieeksemplar (KEM 0806-1/KEM 0807-1) foreligger ved Avdeling for farmakognosi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

5.3.2 Ekstraksjon av plantemateriale

5.3.2.1 Blad

Bladene (859 g) fra *S. canadensis* ble lagt i romtemperatur i et døgn for opptining. Deretter ble de lagt i et stort begerglass og ekstrahert med 3,0 liter 80 % vandig etanol ved romtemperatur. Etanolen ble helt over plantematerialet slik at løsningen dekket plantematerialet helt. Begerglasset ble dekket med aluminiumsfolie for å hindre at etanolen fordampet. Etter ekstraheringen ble etanolløsningen dampet inn på rotavapor og oljepumpe. Plantematerialet ble ekstrahert med løsningsmiddel til det ikke ble ekstrahert mer farget materialet. Totalt ble ekstraksjonen foretatt tre ganger, hvor hver ekstraksjon varte i ett døgn. De tre ekstraktene fra bladene ble slått sammen til et råekstrakt.

5.3.2.2 Blomst

Blomstene (539 g) ble tinet opp og ekstrahert som beskrevet i avsnitt 5.3.2.1 Blad. Totalt ble ekstraksjonen foretatt tre ganger, henholdsvis ett døgn ved første og andre ekstraksjon, to døgn ved siste ekstraksjon.

5.3.2.3 Rot

Røttene ble først vasket med kaldt vann for å fjerne jordrester. Rothår og røtter ble så adskilt, og lufttørket ved romtemperatur i 35 dager på labbenken. Både rothår og røtter ble oppmalt i en kvernemaskin med en 4 mm sikt. Det oppmalte plantematerialet (142,6 g) ble ekstrahert med 1,0 liter 80 % vandig etanol ved romtemperatur i et døgn. Ny ekstraksjon ble foretatt med samme mengde etanolløsning og varte i fire døgn.

5.3.2.4 Stengel

Stenglene (557 g) ble ekstrahert på samme måte som de andre overjordiske delene, men til forskjell fra de andre plantedelene varte første ekstraksjon i tre døgn. Dette gav et lite utbytte, derfor ble stenglene malt i en kvernemaskin. Dette for at upolare stoffer skulle bli lettere trukket ut fra plantematerialet. Etter oppmalingen ble det utført to ekstraksjoner, hvor hver ekstraksjon varte i ett døgn. De samlede ekstraktene ble inndampet på samme måte som de andre overjordiske delene.

5.3.2.5 Utbytte av råekstrakt

Utbytte av alle råekstraktene er vist i Tabell 6.1.1 i kapittel 6 Resultat og diskusjon.

5.3.2.6 NMR-spektroskopi

Anvendte løsemidler og hvilke type NMR-spektra som ble opptatt for de forskjellige råekstraktene er som vist i Tabell 5.3.1. TMS ble brukt som intern standard.

Tabell 5.3.1 *Anvendte løsemidler og type NMR-spektra for alle råekstraktene*

Type råekstrakt	Deutererte løsesmidler			Type spektra	
	Kloroform	Metanol	Aceton	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
Blad	-	x	-	x	x
Blomst	-	x	-	x	-
Rot	-	x	-	x	-
Stengel	-	x	-	x	-

5.3.2.7 Bioassay

Alle råekstraktene ble testet for radikalscavenging (DPPH-testen) og for 15-lipoksygenase hemming (15-LO-testen) ved forskjellige konsentrasjoner. Resultatet av DPPH-testen og 15-LO-testen er vist i Tabell 6.1.2 og 6.1.3 i kapittel 6 Resultat og diskusjon og Tabell 1.2.1 og 1.2.2 i vedleggsdelen.

Toksisitetstesten (Brine-Shrimp lethality assay) ble også utført for råekstraktene ved konsentrasjonene 10 µg/ml, 100 µg/ml og 1000 µg/ml. Resultatet av testen er vist i Tabell 6.1.4 i kapittel 6 Resultat og diskusjon.

5.3.3 Ekstraksjon av råkstrakt

5.3.3.1 Blad råkstrakt

Væske-væske ekstraksjon

Blad råkstraktet (105,3 g) ble suspendert i 0,6 liter destillert vann og overført til en skilletrakt. Suspensjonen ble ekstrahert med løsninger av økende polaritet som vist i skjemaet under:

Mengde	Løsemidler		
	Diklormetan	Etylacetat	1-Butanol
	6 x 200 ml	8 x 200 ml	5 x 200 ml

Etter hver tilsetning av løsemiddel ble skilletrakten ristet kraftig. Da fasene hadde separert seg ble den organiske fasen tappet av og filtrert over i innveide rundkolber, og deretter dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Både etylacetat- og 1-butanolfasene ble filtrert gjennom Whatman 1PS faseparasjonsfilter før inndamping.

Etter siste ekstraksjon av blad råkstraktet med 1-butanol var det igjen en rødbrun vandig rest. Denne vandige resten ble dampet inn til tørrhet på samme måte som de andre fasene. På grunn av vanskelighet med overkoking og voldsomt skumming ble kun en del av den vandige fasen dampet inn til tørrhet.

Utbytte av alle ekstraktene er vist i Tabell 6.2.1 i kapittel 6 Resultat og diskusjon. Oversikt over ekstraksjon av blad råkstrakt er vist i Flytskjema 1.1.1 i vedleggsdelen.

5.3.3.2 Blomst råkstrakt

Væske-væske ekstraksjon

Råkstraktet blomst (48,2 g) ble først suspendert i 0,6 l destillert vann, deretter ekstrahert og inndampet som beskrevet i avsnitt 5.3.3.1. Blad råkstrakt. Ekstraksjonen ble utført som vist i skjemaet under:

Mengde	Løsemidler		
	Diklormetan	Etylacetat	1-Butanol
	4 x 200 ml	7 x 200 ml	4 x 200 ml

Utbytte av de forskjellige ekstraktene er vist i Tabell 6.2.1 i kapittel 6 Resultat og diskusjon. Oversikt over ekstraksjon av blomst råkstrakt er vist i Flytskjema 1.1.2 i vedleggsdelen.

5.3.3.3 Rot rækstrakt

Væske-væske ekstraksjon

Rækstraktet rot (20,9 g) ble suspendert i 240 ml diklormetan-etylacetat (1:1, v/v). Blandingen ble ekstrahert i skilletrakt med 2x 120 ml destillert vann. Etter kraftig risting ble det dannet tre faser: organisk fase (diklormetan-etylacetat), melkeaktig interfase og vannfase. Disse tre fasene ble separert fra hverandre og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Den organiske fasen ble filtrert gjennom Whatman 1PS faseseparasjonsfilter før inndamping. Den vandige fasen til rot rækstraktet skummet nesten ikke under inndampingen, men det var kun en del av den som ble dampet inn. Dette på grunn av tidsmangel.

Utbytte av ekstraktene er vist i Tabell 6.2.1 i kapittel 6 Resultat og diskusjon. Oversikt over ekstraksjon av rot rækstrakt er vist i Flytskjema 1.1.3 i vedleggsdelen.

5.3.3.4 Stengel rækstrakt

Væske-væske ekstraksjon

Ekstraksjon av stengel rækstrakt (19,2 g) ble utført som beskrevet i avsnitt 5.3.3.1 Blad rækstrakt. Ekstraksjonen ble utført som vist i skjemaet under:

<i>Løsemidler</i>			
Mengde	Diklormetan	Etylacetat	1-Butanol
	4 x 200 ml	6 x 200 ml	6 x 200 ml

Den vandige rødbrune fasen til rækstraktet stengel var vanskelig å dampe inn til tørrhet. Det var mye overkoking og voldsom skumming under inndampingen. På grunn av dette ble kun en del av vannfasen inndampet.

Utbytte av de oppnådde ekstraktene er vist i Tabell 6.2.1 i kapittel 6 Resultat og diskusjon. Oversikt over ekstraksjon av stengel rækstrakt er vist i Flytskjema 1.1.4 i vedleggsdelen.

5.3.3.5 NMR-spektroskopi

Anvendte løsemidler og hvilke type NMR-spektra som ble opptatt for de oppnådde ekstraktene fra rækstraktene blad, blomst, rot og stengel er vist i Tabell 5.3.2-5.3.5.

Tabell 5.3.2 *Anvendte løsemidler og type NMR-spektra for ekstraktene fra blad råekstrakt*

Type ekstrakt	Deutererte løsemidler			Type spektra	
	Kloroform	Metanol	Tungtvann	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
Diklormetan	x			x	
Etylacetat		x		x	x
1-Butanol		x		x	x
Vandig			x	x	

Tabell 5.3.3 *Anvendte løsemidler og type NMR-spektra for ekstraktene fra blomst råekstrakt*

Type ekstrakt	Deutererte løsemidler			Type spektra	
	Kloroform	Metanol	Tungtvann	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
Diklormetan	x			x	x
Etylacetat		x		x	x
1-Butanol		x		x	x
Vandig			x	x	

Tabell 5.3.4 *Anvendte løsemidler og type NMR-spektra for ekstraktene fra rot råekstrakt*

Type ekstrakt	Deutererte løsemidler			Type spektra	
	Kloroform	Metanol	Tungtvann	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
Organisk fase	x			x	
Interfase		x		x	x
Vannfase		x		x	

Tabell 5.3.5 *Anvendte løsemidler og type NMR-spektra for ekstraktene fra stengel råekstrakt*

Type ekstrakt	Deutererte løsemidler				Type spektra	
	Acetone	Kloroform	Metanol	Tungtvann	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
Diklormetan		x			x	
Etylacetat	x				x	x
1-Butanol			x		x	x
Vandig				x	x	

5.3.3.6 Bioassay

DPPH-testen og 15-LO testen ble utført for alle ekstrakter fra råekstraktene blad, blomst, rot og stengel. De ble testet i konsentrasjoner på 166,7 µg/ml, 83,3 µg/ml, 41,7 µg/ml, 20,8 µg/ml

og 10,4 µg/ml. Resultater av bioassaytestene er gitt i Tabellene 6.2.1 i kapittel 6 Resultat og diskusjon, og Tabell 1.2.3-1.2.10 i vedleggsdelen.

5.3.4 Blad etylacetat ekstrakt

5.3.4.1 Fraksjonering av blad etylacetat ekstrakt

Flytskjema for fraksjonering av blad etylacetat ekstraktet (BE) og videre arbeid med de opparbeidede fraksjonene er vist i Flytskjema 1.1.5 i vedleggsdelen.

Analytisk TLC

Før fraksjonering av BE var det ønskelig å finne ut hvilken mobilfase som ville separere stoffene i ekstraktet best ved kolonnekromatografi. BE er et ganske polart ekstrakt, og prøven ble løst i etylacetat og applisert på en omvendt fase C₁₈ TLC plate (RP-18 F_{254s}).

Mobilfase: Metanol
Metanol-vann (3:1)
Metanol-vann (1:1)

VersaFlash kolonne separasjon

Ved kolonne separasjon ble det brukt en C₁₈-bundet silikakolonne (40x150 mm). Kolonnen ble først kondisjonert med metanol og deretter med metanol-vann (1:1). BE (5,7 g) ble løst i 20 ml metanol. Dette løste ikke ekstraktet fullstendig, blandingen ble så satt på ultralydbad i omtrent 3 minutter. Dette gjorde at ekstraktet ble fullstendig oppløst. Mobilfaser som ble benyttet var forskjellige blandingsforhold av metanol-vann. Det ble benyttet gradient eluering og startet med metanol-vann (1:1), deretter med økende mengde av metanol.

Det ble i alt samlet 55 kolonnefraksjoner. For oversikt over hvilke mobilfaser som ble brukt ved hvilke kolonnefraksjoner, se Tabell 1.2.11 i vedleggsdelen.

Analytisk TLC

Kolonnefraksjoner fra BE ble testet på en omvendt fase C₁₈ TLC plate (RP-18F_{254s}).

Mobilfase: Metanol-vann (3:1), for kolonnefraksjonene 1-25
Metanol, for kolonnefraksjon 27-55

Etter at TLC platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med DPPH-løsning. Fraksjoner som så ut til å inneholde de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, se Tabell 1.2.12 i vedleggsdelen. Dette gav fraksjonene BE1-BE9.

NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner fra BE1-BE9 ble analysert ved hjelp av både ^1H - og ^{13}C -NMR spektroskopi, unntatt fraksjon BE1, BE5, BE7-BE9 hvor det bare ble tatt ^1H -NMR spektra. Deuterert metanol ble brukt som løsningsmiddel med TMS som intern standard.

Bioassay

DPPH-testen ble utført for alle fraksjoner ved en konsentrasjon på 10 $\mu\text{g/ml}$, unntatt fraksjon BE1 og BE9 som ikke ble testet. Resultater av bioassaytesten er gitt i Tabell 1.2.13 i vedleggsdelen.

Krystallisasjon

Etter at det ble tatt NMR-spektroskopi av fraksjonene BE2-BE9, ble de satt til delvis inndamping. Det ble dannet krystaller i fraksjon BE3 ved henstand over natt ved romtemperatur. Den ble så plassert på kjølerom i ett døgn for bedring av utkrystallisering. Deretter ble fraksjonen sentrifugert og krystallene isolert ved at supernatanten ble fjernet hjelp av en Pasteurpipette. De isolerte krystallene ble så løst i metanol og deretter inndampet på rotavapor og oljepumpe.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H - NMR spektra av krystallene og supernatanten til fraksjon BE3. Deuterert DMSO ble brukt som løsningsmiddel for krystallene, mens deuterert metanol ble brukt for supernatanten. TMS ble benyttet som intern standard.

5.3.4.2 Fraksjonering av BE1

VersaFlash kolonneseparasjon

Fraksjon BE1 (3,37 g), ”gjennombruddsfraksjon”, ble løst i 20 ml 50 % vandig metanol. Kolonnen ble kondisjonert med 500 ml metanol-vann (1:1) og BE1 ble kromatografert som beskrevet i avsnitt 5.3.4.1 Fraksjonering av blad etylacetat ekstrakt. Gjenværende stoff ble

vasket ut med aceton og deretter med metanol. Det ble i alt samlet 40 kolonnefraksjoner. I kolonnefraksjoner 5-17 og 22-26 ble det dannet krystaller ved henstand over natt ved romtemperatur. Krystallene ble isolert ved hjelp av glassintertrakt. For oversikt over hvilke mobilfaser som ble brukt, se Tabell 1.2.14 i vedleggsdelen.

Analytisk TLC

Alle fraksjoner og krystaller ble testet på en omvendt fase C₁₈ TLC plate (RP-18F_{254s}).

Mobilfase: Metanol-vann (3:1), for kolonnefraksjonene 1-36 og krystallene
Metanol, for kolonnefraksjon 37-40 og krystallene

Etter at TLC platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med DPPH-løsning. Fraksjoner som så ut til å inneholde de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, se Tabell 1.2.15 i vedleggsdelen. Dette gav fraksjonene BE1.0-BE1.13.

NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner og krystaller ble analysert ved hjelp av både ¹H- og ¹³C-NMR spektroskopi. Deuterert metanol ble brukt som løsningsmiddel med TMS som intern standard.

Bioassay

DPPH-testen ble utført for fraksjonene BE1.0-BE1.11 ved en konsentrasjon på 10 µg/ml. Resultater er gitt i Tabell 1.2.16 i vedleggsdelen.

Krystallisasjon

Det ble dannet krystaller i fraksjonene BE1.0, BE1.3-BE1.5 og BE1.7 etter at løsningene til disse fraksjonene ble satt til henstand over natt ved romtemperatur. De ble så plassert på kjølerom i ett døgn for bedring av utkrystallisering. Krystallene ble isolert ved at supernatanten ble fjernet med en Pasteurpipette.

Krystallene fra kolonnefraksjoner 5-17 og 22-26 løste seg dårlig i metanol og gav utfelling (2. utkrystallisering) i NMR-røret. De ble isolert som nevnt ovenfor.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H - NMR spektra av krystaller til den 2. utkrystallisering av kolonnefraksjonene 5-17 og kolonnefraksjonene 22-26, og krystallene til fraksjonene BE1.0, BE1.3-BE1.5 og BE1.7. Det ble i tillegg tatt ^{13}C -NMR-spektra av krystaller til den 2. utkrystallisering av 5-17 og kolonnefraksjonene 22-26. Deuterert DMSO ble brukt som løsningsmiddel med TMS som intern standard.

5.3.4.3 Fraksjonering av BE1.1

VersaFlash kolonnekolonneparasjon

Kolonnen ble kondisjonert med metanol-vann (3:7). Fraksjon BE1.1 (0,6 g) ble løst i 13 ml 30 % vandig metanol og kromatografert som beskrevet i avsnitt 5.3.4.1 Fraksjonering av blad etylacetat ekstrakt. Gjenværende stoff ble vasket ut med metanol-vann (1:1) og deretter med aceton. Det ble i alt samlet 40 kolonnefraksjoner. For oversikt over hvilke mobilfaser som ble brukt ved hvilke kolonnefraksjoner, se i Tabell 1.2.17 i vedleggsdelen.

Analytisk TLC

Alle fraksjoner ble testet på en omvendt fase C_{18} TLC plate (RP-18F_{254s}).

Mobilfase: Metanol-vann (1:1)

Etter at TLC platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med DPPH-løsning. Fraksjoner som så ut til å inneholde de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, se Tabell 1.2.18 i vedleggsdelen. Dette gav fraksjonene BE1.1.1-BE1.1.12.

NMR-spektroskopi

Fraksjoner BE1.1.1-BE1.1.12 ble analysert ved hjelp av både ^1H - og ^{13}C -NMR spektroskopi. Deuterert metanol ble brukt som løsningsmiddel med TMS som intern standard.

Krystallisasjon

Det ble dannet krystaller i fraksjon BE1.1.7 ved henstand over natt ved romtemperatur. Fraksjonen ble så plassert på kjølerom i ett døgn for bedring av utkrystallisering. Krystallene ble isolert ved at supernatanten ble fjernet ved hjelp av en Pasteurpipette.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp ^1H - NMR spektrum av krystallene til fraksjon BE1.1.7. Deuterert DMSO ble brukt som løsningsmiddel med TMS som intern standard.

5.3.4.4 Fraksjonering av BE1.2

VersaFlash kolonne separasjon

Fraksjon BE1.2 (0,65 g) ble løst i 13 ml 30 % vandig metanol. Kolonnen ble kondisjonert på forhånd med metanol-vann (3:7) og BE1.2 ble kromatografert som beskrevet i avsnitt 5.3.4.1 Fraksjonering av blad etylacetat ekstrakt. Gjenværende stoff ble vasket ut med metanol-vann (1:1) og deretter med aceton. Det ble i alt samlet 33 kolonnefraksjoner. For oversikt over hvilke mobilfaser som ble brukt, se Tabell 1.2.19 i vedleggsdelen.

Analytisk TLC

Alle fraksjoner ble testet på en omvendt fase C_{18} TLC plate (RP-18F_{254s}).

Mobilfase: Metanol-vann (1:1), for kolonnefraksjonene 1-9
Metanol-vann (7:3), for kolonnefraksjonene 10-33

Etter at TLC platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med DPPH-løsning. Fraksjoner som så ut til å inneholde de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, se Tabell 1.2.20 i vedleggsdelen. Dette gav fraksjonene BE1.2.1-BE1.2.7.

NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner fra BE1.2.1-BE1.2.7 ble analysert ved hjelp av både ^1H - og ^{13}C -NMR spektroskopi. Deuterert metanol ble brukt som løsningsmiddel med TMS som intern standard.

Krystallisasjon

Det ble dannet krystaller i løsninger av fraksjonene BE1.2.3 og BE1.2.4 ved henstand over natt ved romtemperatur. Fraksjonene ble så plassert på kjølerom i ett døgn for bedring av utkrystallisering. Krystallene ble isolert ved at supernatanten ble fjernet ved hjelp av en Pasteurpipette.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp ^1H - og ^{13}C -NMR- spektre av krystallene til fraksjonene BE1.2.3 og BE1.2.4. Deuterert DMSO ble brukt som løsningsmiddel med TMS som intern standard.

5.3.4.5 Isolerte krystaller

Bioassay

Det ble isolert fem rene krystallinske forbindelser fra BE, og de ble testet for radikalscavenging (DPPH-testen) og for 15-lipoksygenase hemming (15-LO-testen) ved forskjellige konsentrasjoner. Resultater er vist Tabell 6.3.1 og Tabell 6.3.2 i kapittel 6 Resultat og diskusjon og Tabell 1.2.21 og Tabell 1.2.22 i vedleggsdelen.

5.3.5 Rot organisk ekstrakt

5.3.5.1 Fraksjonering av rot organisk ekstrakt

Flytskjema for fraksjonering av rot organisk ekstraktet (RO) og videre arbeid med de opparbeidede fraksjonene er vist i Flytskjema 1.1.6-1.1.9.

Analytisk TLC

Før fraksjonering av RO er det viktig å finne ut på forhånd hvilken mobilfase som ville separere stoffene i ekstraktet best ved kolonneseparasjon. RO ble testet på normalfase silika TLC plater. Litt av ekstraktet ble løst i aceton, 10 μl av prøveløsning ble applisert på en normal fase TLC plate (silikagel 60 F₂₅₄) som så ble utviklet med ulike mobilfaser.

Mobilfase: Diklormetan
 Etylacetat
 Kloroform
 Diklormetan-etylacetat(1:1)
 Kloroform-etylacetat (9:1)

VersaFlash kolonneseparasjon

Ved kolonneseparasjon ble det brukt en normalfase silikakolonne (40x150 mm). Kolonnen ble kondisjonert med ca 250 ml diklormetan. RO (3,3 g) ble løst i 20 ml diklormetan og applisert på kolonnen.

Mobilfase: Diklormetan
Diklormetan-etylacetat (9:1)
Diklormetan-etylacetat (8:2)
Diklormetan-etylacetat (1:1)
Etylacetat
Aceton

De nevnte mobilfasene var funnet ved analytisk TLC å separere komponentene i RO ekstraktet best. Fraksjoner med varierende størrelser ble samlet opp. Gjenværende stoff på kolonnen ble skylt ut med 300 ml aceton. Det ble i alt samlet 101 kolonnefraksjoner. For oversikt over hvilke mobilfaser som ble brukt ved hvilke kolonnefraksjoner, se Tabell 1.2.23 i vedleggsdelen.

Analytisk TLC

Kolonnefraksjoner fra RO ble testet på normal fase silika TLC.

Mobilfase: Diklormetan, for kolonnefraksjonene 1-59
Diklormetan-etylacetat (9:1), for kolonnefraksjonene 61-101

Etter at TLC platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens. Fraksjoner som så ut til å inneholde de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, se Tabell 1.2.24 i vedleggsdelen. Dette gav fraksjonene RO1-RO12.

NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner fra RO ble analysert ved hjelp av ^1H - og ^{13}C -NMR spektroskopi, med unntatt av fraksjonene RO1, RO3 og RO4 hvor det kun ble tatt opp ^1H -spektrum. Deuterert kloroform ble brukt som løsningsmiddel med TMS som intern standard.

Bioassay

Fraksjonene RO5-RO12 ble testet for radikalscavenging (DPPH-testen) og for 15-lipoksygenase hemming (15-LO-testen) ved forskjellige konsentrasjoner. Fraksjonene RO1-RO4 ble ikke testet, grunnet for liten stoffmengde. Resultatet av DPPH-testen og 15-LO-

testen er vist i Tabell 1.2.25 og 1.2.26 i vedleggsdelen.

Toksisitetstesten (Brine-Shrimp lethality assay) ble kun utført på fraksjon RO6 (solidagenon) ved konsentrasjonene 10 µg/ml, 100 µg/ml og 1000 µg/ml. Dette på grunn av tidsmangel. Resultatet av testen er vist i Tabell 6.4.1 i kapittel 6 Resultat og diskusjon.

5.3.5.2 Fraksjonering av RO7

Analytisk TLC

Analytisk TLC ble utført for å finne ut hvilken mobilfase som egnet seg best til separasjon av fraksjon RO7. En liten mengde av prøven ble løst i aceton, 10 µl av denne ble så applisert på en normal fase TLC plate (silikagel 60 F₂₅₄).

Mobilfase: Diklormetan-etylacetat (9:1)

Kloroform-etylacetat (19:1)

TLC platene ble betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens. På bakgrunn av dette ble den mobilfasen som separerte komponentene i RO7 best valgt ut som mobilfase for VersaFlash kolonne-separasjon.

VersaFlash kolonne-separasjon

Fraksjon RO7 (188 mg) ble løst i 2,5 ml etylacetat og kromatografert som beskrevet i avsnitt 5.3.5.1 Fraksjonering av rot organisk ekstrakt. Kolonnen var forhåndsfuktet med 200 ml kloroform.

Mobilfase: Kloroform-etylacetat (19:1)

Etylacetat

Aceton

Gjenværende stoff på kolonnen ble skylt ut med 300 ml aceton. I alt ble det samlet 32 kolonnefraksjoner.

Analytisk TLC

Alle fraksjoner ble undersøkt på normal fase analytisk TLC (silikagel 60 F₂₅₄).

Mobilfase: Kloroform-etylacetat (19:1)

Etter at TLC platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens. På bakgrunn av dette ble fraksjonene slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, se Tabell 1.2.27 i vedleggsdelen. Dette gav fraksjonene RO7.1-RO7.8.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt både ^1H - og ^{13}C -NMR spektra av fraksjonene RO7.1 - RO7.8, med unntatt av fraksjon RO7.1 og RO7.2 hvor det kun ble tatt opp ^1H -NMR spektrum. Deuterert kloroform ble brukt som løsningsmiddel med TMS som intern standard.

5.3.5.3 Videre separasjon av RO7.4

Analytisk HPLC

Fraksjonene RO7.4 ble undersøkt ved analytisk HPLC på en C_{18} analytisk HPLC kolonne. En liten prøve av den nevnte fraksjonen ble først løst i litt metanol. Dette gav dårlig løselighet. En ny mengde av prøven ble så løst i litt kloroform, filtrert gjennom Millex filter og injisert. Deteksjonen ble foretatt ved 230 nm, injeksjonsvolumet var 20 μl og mobilfasen bestod av forskjellige blandingsforhold av metanol (B) og vann (A). Det ble benyttet gradient eluering. Tre gradientsystemer ble testet ut for de to nevnte fraksjonene, se Tabell 5.3.6-5.3.8.

Tabell 5.3.6 Gradientsystem 1 for analytisk HPLC av fraksjon RO7.4

<i>Tid (min)</i>	<i>% A (vann)</i>	<i>% B (metanol)</i>	<i>Mobilfasehastighet (ml/min)</i>
0	50	50	0,8
30	10	90	0,8
45	10	90	0,8
60	50	50	0,8

Tabell 5.3.7 Gradientsystem 2 for analytisk HPLC av fraksjon RO7.4

<i>Tid (min)</i>	<i>% A (vann)</i>	<i>% B (metanol)</i>	<i>Mobilfasehastighet(ml/min)</i>
0	30	70	0,8
20	10	90	0,8
35	10	90	0,8
40	30	70	0,8

Tabell 5.3.8 Gradientsystem 3 for analytisk HPLC av fraksjon RO7.4

<i>Tid (min)</i>	<i>% A (vann)</i>	<i>% B (metanol)</i>	<i>Mobilfasehastighet (ml/min)</i>
0	50	50	0,8
15	10	90	0,8
30	10	90	0,8
35	50	50	0,8

Preparativ HPLC

Fraksjon RO7.4 (28,7 mg) ble løst i 1 ml kloroform og filtrert gjennom Millex filter. Løsningen ble så injisert på en C₁₈ preparativ HPLC kolonne. Mobilfasehastigheten var 20 ml/min og deteksjonen ble foretatt ved 230 nm. Mobilfasen bestod av metanol og vann, og gradientsystem 1 ble benyttet, se Tabell 5.3.6 og 5.3.9. Dette systemet var funnet ved analytisk HPLC å gi best separasjon av komponentene i fraksjon RO7.4. For hver stor topp som ble detektert, ble det samlet opp fraksjoner som ble dampet inn på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene RO7.4.1-RO7.4.10.

Tabell 5.3.9 Gradientsystem for preparativ HPLC av fraksjon RO7.4

<i>Tid (min)</i>	<i>% A (vann)</i>	<i>% B (metanol)</i>	<i>Mobilfasehastighet (ml/min)</i>
0	50	50	20
30	10	90	20
45	10	90	20
60	50	50	20

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektra av alle fraksjoner. Deuterert kloroform ble brukt som løsningsmiddel og TMS som intern standard.

Analytisk HPLC

Litt av fraksjonene RO7.4.2B, RO7.4.4 og RO7.4.5 ble løst i kloroform og undersøkt ved analytisk HPLC på samme måte som beskrevet i begynnelsen av dette avsnittet (5.3.5.3 Videre separasjon av RO7.4). Det ble benyttet Gradientsystem 1.

Sammenslåing av fraksjoner

På bakgrunn av resultater fra analytisk HPLC og NMR-spektra ble fraksjonene RO7.4.2B, RO7.4.4 og RO7.4.5 slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette

gav fraksjon RO7.4.S.

5.3.5.3.1 Videre arbeid med RO7.4.S

NMR-spektroskopi

Det ble tatt COSY, HMBC, HSQC, ^1H - og ^{13}C -NMR spektra av fraksjon RO7.4.S med samme løsningsmiddel og intern standard som enkelte fraksjoner fra RO7.4.

Massespektroskopi

Det ble tatt opp massespektrum av fraksjonene RO7.4.S på et LC-MS apparat. Fraksjonen var løst i acetonitril og fortynnet med acetonitril-vann (1:1) til en konsentrasjon på ca 50 µg/ml, deretter ble den eluert på en silika C_{18} analytisk HPLC kolonne. Forskjellige blandingsforhold av metanol og vann ble benyttet som mobilfase og gradient eluering ble benyttet, se Tabell 5.3.10. Ioniseringsmetoden var APCI og massemålingene ble foretatt både i positiv og negativ mode. LC-MS-analysen ble utført av Trine Grønhaug Halvorsen ved Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Tabell 5.3.10 *Gradientsystem for LC-MS kjøring*

<i>Tid (min)</i>	<i>% A (vann)</i>	<i>% B (metanol)</i>	<i>Mobilfasehastighet (ml/min)</i>
0	50	50	0,8
30	10	90	0,8
45	10	90	0,8
46	50	50	0,8
60	50	50	0,8

UV-spektroskopi

Det ble tatt opp UV-spektrum for fraksjon RO7.4.S. Acetonitril ble brukt både som løsningsmiddel og blindprøve.

5.3.5.4 Videre separasjon av RO7.5

Analytisk HPLC

Litt av fraksjon RO7.5 ble først løst i kloroform og undersøkt ved analytisk HPLC på samme måte som beskrevet i avsnitt 5.3.5.3 Videre separasjon av RO7.4. Gradientsystem 1 ble benyttet.

Preparativ HPLC

Fraksjon RO7.5 (33,2 mg) ble løst i 2 ml kloroform og filtrert gjennom Millex filter. 1 ml (ca 16,6 mg) av denne løsningen ble først fraksjonert ved preparativ HPLC som beskrevet i avsnitt 5.3.5.3 Videre separasjon av RO7.4. Hovedtoppene ble samlet opp. Dette gav fraksjonene RO7.5.1-RO7.5.18. Deretter ble resten av løsningen til RO7.5 (kalt for RO7.5R) på ca 1 ml (ca 16,6 mg), fraksjonert på samme måte. Dette gav fraksjon RO7.5R1-RO7.5R13.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp ^1H -NMR-spektra av alle fraksjoner. Deuterert kloroform ble brukt som løsningsmiddel og TMS som intern standard.

Analytisk HPLC

Litt av fraksjonene RO7.5.5, RO7.5.7, RO7.5.9, RO7.5.11, RO7.5.12, RO7.5.13, RO7.5R6, RO7.5R8, RO7.5R10, RO7.5.R12 ble løst i kloroform og undersøkt ved analytisk HPLC på samme måte som beskrevet i avsnitt 5.3.5.3 Videre separasjon av RO7.4. Det ble benyttet Gradientsystem 1.

Sammenslåing av fraksjoner fra RO7.5

På bakgrunn NMR-spektra og resultater av analytisk HPLC ble fraksjonene slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene RO7.5.S1-RO7.5.S4.

5.3.5.4.1 Videre arbeid med RO7.5.S1-RO7.5.S4

NMR-spektroskopi

Det ble utført COSY, HMBC, HSQC, ^1H - og ^{13}C -NMR-spektroskopi av fraksjon RO7.5.S1 - RO7.5.S4.

Massespektroskopi

Det ble tatt opp massespektrum av fraksjonene RO7.5.S1-RO7.5.S4 på et LC-MS apparat som beskrevet i avsnitt 5.3.5.3 Videre separasjon av RO7.4.

5.3.5.5 Fraksjonering av RO10

VersaFlash kolonnekromatografi

Av fraksjon RO10 ble 200 mg løst i 2,2 ml etylacetat og kromatografert som beskrevet under

avsnitt 5.3.5.1 Fraksjonering av rot organisk ekstrakt. Kolonnen var forhåndsfuktet med diklormetan-etylacetat (2:1).

Mobilfase: Diklormetan-etylacetat (2:1)
Diklormetan-etylacetat (1:1)
Etylacetat
Aceton

Gjenværende stoff på kolonnen ble skylt ut med 300 ml aceton. I alt ble det samlet 42 kolonnefraksjoner.

Analytisk TLC

Alle fraksjoner ble undersøkt på normal fase analytisk TLC (silikagel 60 F₂₅₄).

Mobilfase: Diklormetan-etylacetat (2:1)

Etter at TLC platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens. På bakgrunn av dette ble fraksjonene slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, se Tabell 1.2.28 i vedleggsdelen. Dette gav fraksjonene RO10.1-RO10.3.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp ¹H- og ¹³C-NMR spektra av fraksjonene RO10.1 – RO10.3. Deuterert kloroform ble brukt som løsningsmiddel.

5.3.5.6 Videre separasjon av RO10.1

Analytisk TLC

Dette ble utført for å finne ut hvilken mobilfase som egnet seg best til separasjon av fraksjon RO10.1 på sentrifugert akselerert TLC. En liten mengde av prøven ble løst i aceton, denne ble så applisert på en normal fase TLC plate (silikagel 60 F₂₅₄).

Mobilfase: Diklormetan-acetone (9:1)
Petroleumseter-etylacetat (1:1)

Petroleumseter-acetone (4:1)

Petroleumseter-kloroform (1:1)

TLC platene ble betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens. På bakgrunn av dette ble den mobilfasen som separerte komponentene i RO10 best, benyttet som mobilfase.

Sentrifugalt akselerert TLC (CA-TLC)

CA-TLC ble utført på 2mm sjikt av silikagel PF₂₅₄, gipsholdig. Deretter ble den kondisjonert med petroleumseter-aceton (4:1). Fraksjon RO10.1 (50,0 mg) ble løst i 2 ml etylacetat og applisert på TLC platen.

Mobilfase: Petroleumseter-aceton (4:1)

Diklormetan-aceton (9:1)

Etylacetat

Aceton

Separasjonen av stoffene kunne følges visuelt ved hjelp av UV-bestråling (254 nm), og fraksjonene ble samlet opp ut fra dette. Det ble i alt samlet 9 fraksjoner.

Analytisk TLC

Alle fraksjoner ble undersøkt på normal fase analytisk TLC (silikagel 60 F₂₅₄).

Mobilfase: Diklormetan-aceton (9:1)

Petroleumseter-aceton (4:1)

TLC platene ble betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens. På bakgrunn av dette ble fraksjonene slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, se Tabell 1.2.29 i vedleggsdelen. Dette gav fraksjonene RO10.1.1-RO10.1.3.

NMR-spektroskopi

Det ble utført ¹H- NMR-spektroskopi av fraksjonene RO10.1.1 – RO10.1.3 Det ble også utført ¹³C-NMR-spektroskopi for fraksjon RO10.1.1. Deuterert kloroform ble brukt som

løsningsmiddel og TMS som intern standard.

5.3.5.7 Videre separasjon av RO10.2

Sentrifugalt akselerert TLC

Fraksjon RO10.2 (75 mg) ble løst i 2 ml etylacetat og fraksjonert ved sentrifugalt akselerert TLC som beskrevet under avsnitt 5.3.5.6 Videre separasjon av RO10.1. Det ble i alt samlet 10 fraksjoner.

Analytisk TLC

Alle fraksjoner ble undersøkt på normal fase analytisk TLC (silikagel 60 F₂₅₄).

Mobilfase: Diklormetan-aceton (9:1)

Petroleumseter-aceton (4:1)

TLC platene ble betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens. På bakgrunn av dette ble fraksjonene slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, se Tabell 1.2.30 i vedleggsdelen. Dette gav fraksjonene RO10.2.1-RO10.2.5.

NMR-spektroskopi

Det ble utført ¹H- NMR spektroskopi av fraksjonene RO10.2.1 – RO10.2.5. For fraksjon RO10.2.2 ble det også utført ¹³C-NMR spektroskopi. Deuterert kloroform ble brukt som løsningsmiddel med TMS som intern standard.

UV-spektroskopi

Det ble tatt opp UV-spektrum for fraksjon RO10.2.2. Metanol ble brukt både som løsningsmiddel og blindprøve.

5.3.5.8 Videre separasjon av RO10.2.2

Analytisk HPLC

En liten mengde av fraksjonene RO10.2.1 og RO10.2.2 ble løst i metanol og undersøkt ved analytisk HPLC som beskrevet i avsnitt 5.3.5.3 Videre separasjon av RO7.4. Gradientsystem 1 ble benyttet (Tabell 5.3.6).

Preparativ HPLC

Fraksjon RO10.2.2 (33,2 mg) ble løst i 2 ml metanol og filtrert gjennom Millex filter. Under filtreringen veltet dramglasset, slik at en del av stoffet til RO10.2.2 gikk tapt. 1 ml (ca 12 mg) av denne løsningen ble først fraksjonert ved preparativ HPLC på samme måte som beskrevet i avsnitt 5.3.5.3 Videre separasjon av RO7.4. Hovedtoppene som kom frem i kromatogrammet ble samlet opp. Dette gav fraksjonene RO10.2.2.1-RO10.2.2.5. Deretter ble det utført følgende fraksjonering hvor alle ble fraksjonert på samme måte som sist nevnte:

- 1) Resten av løsningen til RO10.2.2, ca 0,5 ml. Dette gav fraksjonene RO10.2.2. R1-RO10.2.2. R3.
- 2) Fraksjon RO10.2.2.2 (5,4 mg), løst i 1 ml metanol. Dette gav fraksjon RO10.2.2.2.1 og RO10.2.2.2.2.
- 3) Fraksjon RO10.2.2.3 (4,4 mg), løst i 2,5 ml metanol. Dette gav fraksjon RO10.2.2.3.1-RO10.2.2.3.4.
- 4) Fraksjon RO10.2.2. R2 (3,0 mg) løst i 1 ml metanol. Dette gav fraksjon RO10.2.2. R2.1-RO10.2.2. R2.5.
- 5) Fraksjon RO10.2.2.3.2 (2,2 mg) løst i 1 ml metanol. Det ble benyttet en ny og mindre C₁₈ preparativ HPLC kolonne (RP-18 e, 100-10 mm) og med en flythastighet på 10 ml/min. Fraksjonen ble fraksjonert på samme måte som de andre fraksjonene. Dette gav fraksjonene RO10.2.2.3.2.1-RO10.2.2.3.2.5.

NMR-spektroskopi

Det ble utført ¹H- NMR spektroskopi av alle fraksjonene. Deuterert kloroform ble brukt som løsningsmiddel med TMS som intern standard.

Massespektroskopi

Det ble tatt opp massespektrum av fraksjon RO10.2.2.2 på et LC-MS apparat som beskrevet i avsnitt 5.3.5.3.1 Videre arbeid med RO7.4.S.

5.3.5.9 Fraksjonering av RO11

Analytisk TLC

For å finne ut hvilken mobilfase som egnet seg best til separasjon av fraksjon RO11, ble det utført analytisk TLC. En liten mengde av prøven ble løst i aceton og applisert på en omvendt fase C₁₈ TLC plate (RP-18 F_{254s}).

Mobilfase for omvendt fase TLC: Metanol
Metanol-vann (3:1)
Metanol-vann (1:1)

Fraksjon RO11 ble også testet på normal fase analytisk TLC (silikagel 60 F₂₅₄).

Mobilfase for normal fase TLC: Diklormetan
Diklormetan-etylacetat (2:1)

VersaFlash kolonneseparasjon

Ved kolonneseparasjon ble det brukt en C₁₈-bundet silikakolonne (40x150 mm). Dette fordi det var denne metoden som var funnet ved omvendt fase TLC å separere komponentene i RO11 best. Kolonnen ble først kondisjonert med metanol, deretter med metanol-vann (1:1). RO11 (338 mg) ble løst i 3 ml metanol og applisert direkte på kolonnen. Mobilfasene som ble benyttet, var forskjellige blandingsforhold av metanol-vann. Det ble benyttet gradient eluering og startet med metanol-vann (1:1), deretter med økende mengde av metanol. Det ble i alt samlet 65 kolonnefraksjoner. For oversikt over hvilke mobilfaser som ble brukt ved hvilke kolonnefraksjoner, se Tabell 1.2.31 i vedleggsdelen.

Analytisk TLC

Kolonnefraksjoner fra RO11 ble undersøkt på en omvendt fase C₁₈ TLC plate (RP-18F_{254s}).

Mobilfase: Metanol-vann (3:1)

Etter at TLC platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens. Fraksjonene som så ut til å inneholde de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, se Tabell 1.2.32 i vedleggsdelen. Dette gav fraksjonene RO11.1-RO11.7.

NMR-spektroskopi

Fraksjonene RO11.2-RO11.7 ble analysert ved ¹H- og ¹³C-NMR spektroskopi, mens fraksjon RO11.1 kun ble analysert ved ¹H-spektroskopi. Deuterert kloroform ble brukt som løsningsmiddel med TMS som intern standard.

UV-spektroskopi

Det ble tatt UV-spektrum av fraksjonene RO11.2 og 11.3. Kloroform-metanol (1:59 v/v) ble først brukt som løsemiddel, men dette gav utfelling. Deretter ble kloroform benyttet både som løsemiddel og blindprøve.

Analytisk HPLC

En liten mengde av frasjonene RO11.2 og RO11.3 ble først løst i kloroform og undersøkt ved analytisk HPLC som beskrevet i avsnitt 5.3.5.3 Videre separasjon av RO7.4. Deteksjonen ble foretatt ved 260 nm.

6 Resultat og diskusjon

6.1 Ekstraksjon av plantemateriale

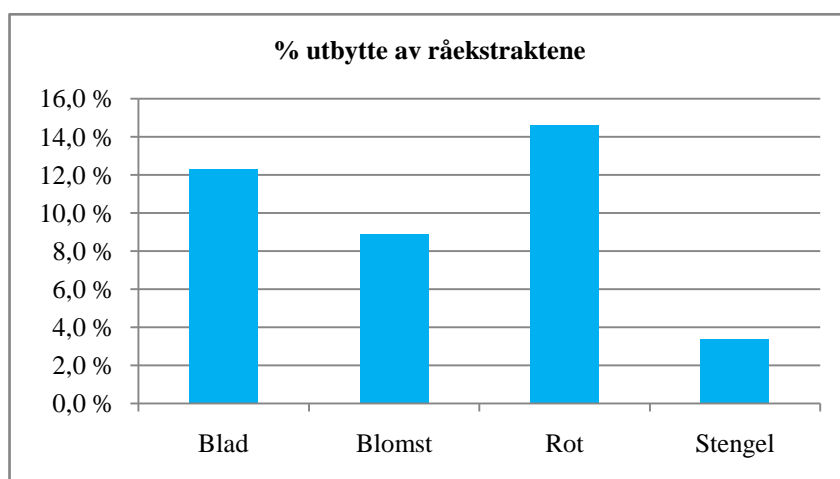
6.1.1 Utbytte av råekstrakt

Ekstraksjon av blad, blomst, stengel og rot fra *S. canadensis* med 80 % etanol gav fire råekstrakter og deres utbytte er vist i Tabell 6.1.1. En løøsning av 80 % etanol tok med seg det meste av polare og upolare stoffer i planten.

Tabell 6.1.1 Utbytte av råekstraktene

Type droge	Vekt av drogen (g)	Vekt av råekstrakt (g)	% utbytte
Blad	859	105,3	12,3 %
Blomst	539	48,2	8,9 %
Rot	142,6	20,9	14,6 %
Stengel	557	19,2	3,4 %

Tabellen viste at det var råekstraktet av rot som gav det største utbytte med 14,6 %, deretter kom blad råekstrakt med 12,3 %. De to resterende råekstraktene gav forholdsvis mindre utbytte med henholdsvis 8,9 % for blomst råekstrakt og 3,4 % for stengel råekstrakt (Figur 6.1.1.). Alle drogene ble ekstrahert med nesten samme prosedyren, unntatt for rot og stengel hvor de også ble oppmalt.



Figur 6.1.1 Utbytte av ekstrakter fra plantemateriale

6.1.2 NMR-spektroskopi

Blad rækstrakt

^1H -NMR-spektret til blad rækstraktet (NMR-spektrum 1) viste en rekke signaler i området 0,8-2,8 ppm, som var området for alifatiske protoner. Ekstraktet inneholdt en del fett som viste signaler rundt 0,88 ppm (CH_3) og 1,29 ppm (CH_2) (Gottlieb *et al.*, 1997). I tillegg hadde spektret signaler i aromat- og olefinområdet ved 5,2-8 ppm (Solomons *et al.*, 2000). Det hadde også tydelige signaler i området 3,2-4,6 ppm som kunne tyde på karbohydrater (Cui, 2005). Signalene ved 1,19, 3,34 og 4,87 ppm antas å vise henholdsvis etanol, metanol og vann (Gottlieb *et al.*, 1997).

^{13}C -NMR-spektret (NMR-spektrum 2) viste signaler i området 20-40 ppm som er typisk for alifatiske karboner. Rækstraktet hadde mange signaler i området 52-110 ppm, dette tydet på at det kunne inneholde karbohydrater. I tillegg hadde spektret tydelige signaler i aromat- og olefinområdet som lå på 100-170 ppm. De nevnte funnene stemte godt overens med det som var funnet i ^1H -NMR-spektret.

Blomst rækstrakt

^1H - NMR-spektret (NMR-spektrum 3) til blomst rækstrakt viste at det inneholdt mye av det samme som blad rækstrakt, men blomst rækstrakt så ut til å inneholde mindre fett.

Rot rækstrakt

^1H - NMR-spektrumet (NMR-spektrum 4) til rot rækstrakt viste at det hovedsakelig inneholdt terpenoider, som kjennetegnes ved singletter i området 0,9-1,8 ppm. Disse signalene skyldes trolig metylgrupper i terpenoider (meddelelse fra K. E. Malterud). Signalene ved 0,88 ppm og 1,29 ppm kunne tyde på at ekstraktet inneholdt fett. Rækstraktet hadde også en del signaler i aromat- og olefinområdet (5,0-7,4 ppm). Ved sammenligning av dette spektrumet med spektret til solidagenon (Anthonsen, 1968), viste at rækstraktet hadde mange signaler som lignet på solidagenon. Spektrumet hadde også signaler i området 3,2-4,6 ppm. Dette indikerte at rækstraktet også kunne inneholde en del karbohydrater. Signalene ved 3,34 og 4,87 ppm skyldtes trolig rester av metanol og vann.

Stengel råekstrakt

¹H- NMR-spektrumet (NMR-spektrum 5) til stengel råekstrakt viste at det inneholdt mye av det samme som blad og blomst råekstrakt, men dette råekstraktet så ut til å inneholde mye fett. Det hadde litt svakere signaler i aromat- og olefinområdet.

6.1.3 Bioassay

DPPH-scavenging

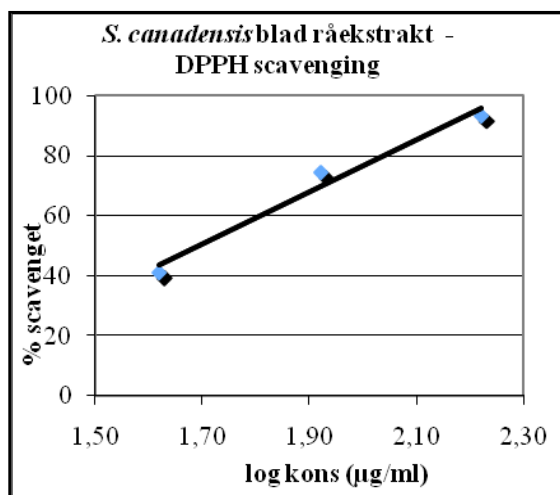
Alle fire råekstraktene ble testet for DPPH-scavenging og resultatet er vist i Tabell 6.1.2 og Tabell 1.2.1 i vedleggsdelen.

Tabell 6.1.2 Radikalscavengeraktivitet til råekstraktene

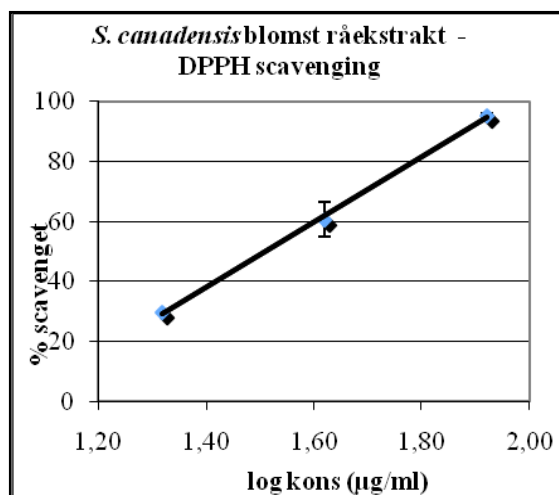
Råekstrakt	IC ₅₀ (�g/ml)
Blad	50 ± 0,7
Blomst	33 ± 2
Stengel	112 ± 6
Rot	98 ± 1

Alle råekstrakter viste signifikant radikalfangende aktivitet. Det var blomst råekstrakt som hadde høyest radikalscavengeraktivitet med en IC₅₀-verdi på 33 ± 2  g/ml. Blad råekstraktet viste noe mindre aktivt enn blomst råekstrakt, mens råekstraktene rot og stengel var lite aktive. Radikalfangeraktiviteten til råekstraktene var doseavhengig.

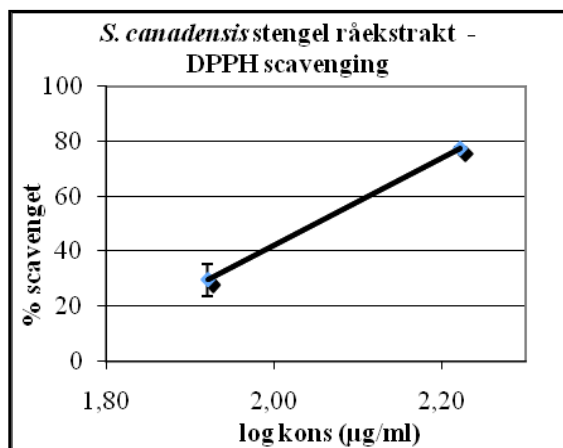
Figur 6.1.2-6.1.5 viser resultatene grafisk.



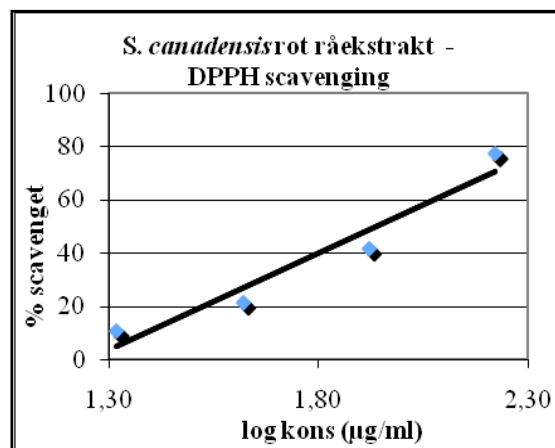
Figur 6.1.2. Radikalfangende aktivitet



Figur 6.1.3 Radikalfangende aktivitet



Figur 6.1.4 Radikalfangende aktivitet



Figur 6.1.5 Radikalfangende aktivitet

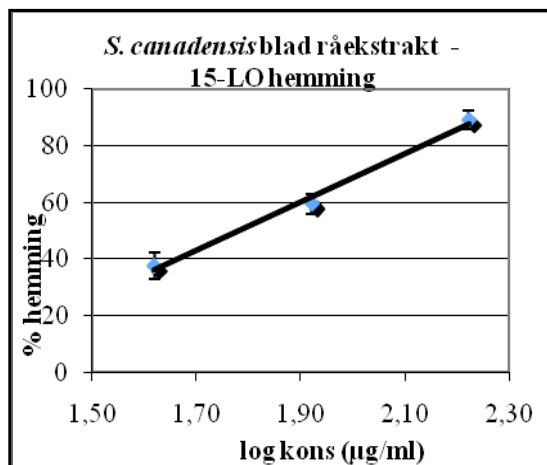
15-LO hemming

Rækstraktene ble testet for 15-LO hemming og resultater er vist i Tabell 6.1.3 og i Tabell 1.2.2 i vedleggsdelen.

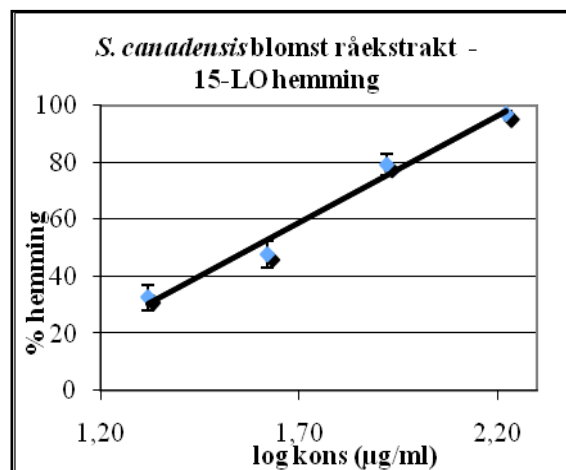
Tabell 6.1.3 Hemming av 15-LO til rækstraktene

Rækstrakt	IC ₅₀ (µg/ml)
Blad	62 ± 8 µg/ml
Blomst	44 ± 5 µg/ml
Stengel	84 ± 12 µg/ml
Rot	32 ± 3 µg/ml

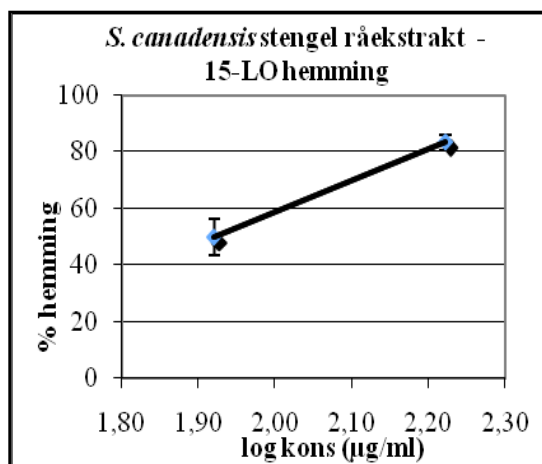
Rækstraktene gav en konsentrasjonsavhengig inhibering av 15-LO-aktiviteten. Det var rot rækstrakt som var mest aktivt med en IC₅₀-verdi på 32 ± 3 µg/ml. Dette var en konsentrasjon som gav 50 % hemming av 15-lipoksygenase. Resten av rækstraktene viste seg å hemme 15-LO i følgende grad: blomst > blad > stengel. Figur 6.1.6-6.1.9 viser resultatene grafisk.



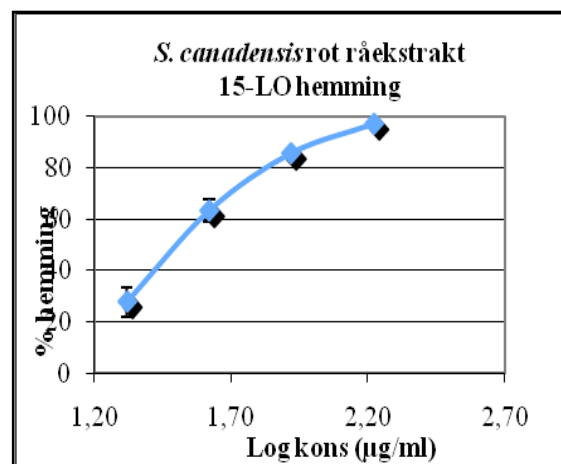
Figur 6.1.6 Grad av enzymhemming



Figur 6.1.7 Grad av enzymhemming



Figur 6.1.8 Grad av enzymhemming



Figur 6.1.9 Grad av enzymhemming

Resultatene av bioassay-testene viste altså at det var blomst råekstrakt som hadde høyest radikalfangende aktivitet, mens rot råekstrakt var mest aktivt til å hemme 15-LO. Dette indikerte at det var ingen korrelasjon mellom radikalfangende evne og hemmingsaktiviteten av 15-LO, og dette stemte godt med det som var funnet i litteraturen fra før (Malterud *et al.*, 1993).

Toksisitetstesten (Brine Shrimp Lethality Assay)

Det ble utført toksisitetstest ved tre ulike konsentrasjoner for alle råekstrakter, og DMSO ble brukt som negativ kontroll. Ved tilsetning av saltvann til 50 µl prøveløsning av rot råekstrakt, ble løsningen blakket og etter hvert ble det dannet et lysegult bunnfall. Dette skjedde ved en konsentrasjon på 1000 µg/ml. Bunnfallet skyldtes sannsynligvis utfelling av lipofile stoffer. Det var sannsynligvis diterpener som hadde felt seg ut, trolig solidagenon som var

hovedbestanddel i roten til *S. canadensis* (Anthonsen *et al.*, 1970). Resultatet av testen er vist i Tabell 6.1.4.

Tabell 6.1.4 Toksisitetstest på råekstraktene

Råekstrakt	% dødelighet ved ulike konstrasjoner		
	1000 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml
Blad	50	3	3
Blomst	20	3	9
Stengel	13	0	3
Rot	70	0	0
DMSO (negativ kontroll) gav 0 % dødelighet			

Som det kom frem av tabellen, var ingen av råekstraktene særlig toksiske for rekellarver i lave dose. Man måtte opp i en relativ høy dose for å kunne oppnå en merkbar dødelighet. Siden tallene som lå til grunn for beregningen av verdiene i tabellen var unøyaktige og råekstraktene var lite toksiske, ble det ansett som unødvendig å beregne LC₅₀-verdier. Selv om denne testen var uspesifikk og unøyaktig, ville den likevel kunne gi en indikasjon på toksisiteten til råekstraktene.

6.2 Ekstraksjon av råekstrakt

Væske-væske ekstraksjon

Råekstraktene blad, blomst og stengel ble grovseparert videre ved væske-væske ekstraksjon ved hjelp av tre løsningsmidler av ulik polaritet. De mest upolare stoffer ble ekstrahert over i diklormetanfasen, mens de mest polare stoffene ble værende igjen i vannfasen. Stoffet med mellomliggende polaritet ble fordelt mellom etylacetat- og butanolfasen. For rot råekstraktet som ble suspendert i diklormetan-etylacetat (organisk fase) og ekstrahert med destillert vann, ville de upolare og litt polare stoffer være i den organiske fasen. Stoffet med høyst polaritet ville også her være igjen i vannfasen.

6.2.1 NMR-spektroskopi

Diklormetan ekstrakter fra blad, blomst og stengel råekstrakt

NMR-spektrene til diklormetanekestraktene (NMR-spektrum 6 -9) så hovedsakelig ut til å bestå av alifatiske bestanddeler som hadde signaler i området 0,8-2,8 ppm. Ekstraktet inneholdt trolig en del fett med signaler rundt 0,86 og 1,26 ppm. Signalene i området 3,2-4,8

ppm kunne tyde på at ekstraktet også inneholdt oksygenerte alifatiske protoner. Ekstraktet hadde også noen signaler i aromat- og olefinområdet som lå ved 5,0-9,5 ppm. Signalene ved 1,56, 5,30 og 7,26 ppm viste henholdsvis vann, diklormetan og kloroform (Gottlieb *et al.*, 1997).

Etylacetat ekstrakter fra blad, blomst og stengel råekstrakt

Både ^1H - og ^{13}C -NMR-spektrene (NMR-spektrum 10-15) til etylacetat ekstraktene så ut til å inneholde interessante signaler i aromat- og olefinområdet (5,2-8,1 ppm). Ekstraktet viste også signaler i det alifatiske området (0,8-2,8 ppm) som kunne være fett og terpenoider. I tillegg hadde spektrene signaler i området 3,2-4,2 ppm som kunne tyde på karbohydrater. Spektrene hadde også en del signaler som stammet fra løsningsmidlet etylacetat. I ^1H -NMR-spektrumet var disse signalene ved 1,24 ppm (CH_2CH_3), 2,01 ppm (CH_3CO) og 4,09 ppm (CH_2CH_3), mens i ^{13}C -NMR-spektrumet var de ved 14,49 ppm (CH_3), 20,88 ppm (CH_3CO), 61,50 ppm (CH_2) og 172,89 ppm (CO). Signalet ved 3,34 ppm og 4,87 ppm i ^1H -NMR-spektrumet skyldtes henholdsvis metanol- og vannrester. Grunnen til at det var signaler fra etylacetat, metanol og vann i spektrene var ufullstendig inndamping av løsningsmidlene etter ekstraheringen.

Butanolekstrakter fra blad, blomst og stengel råekstrakt

^1H - og ^{13}C -NMR-spektrene (NMR-spektrum 16-21) til butanolekstraktene viste signaler i områdene for alifatiske, aromatiske og olefiniske forbindelser. Signalene i ^1H -NMR-spektrumet ved 0,8-1,0 ppm samt de ved 3,34-3,60 ppm og 4,87 ppm var trolig rester av løsningsmidler (butanol, metanol og vann). ^{13}C -NMR-spektrumet hadde en del støy, men signalene i området 60-90 ppm stammet sannsynligvis fra oksygenerte alifatiske karboner.

Ekstrakter fra rot råekstrakt

^1H -NMR-spektrum til rot organisk ekstrakt (diklormetan-etylacetat) liknet på spektrumet til rot interfasen (NMR-spektrum 22-24) og de viste en del signaler i alifatområdet (0,8-2,8 ppm) som kunne tyde på innhold av terpenoider, hovedsakelig solidagenon. Det inneholdt også litt fett (0, 86 og 1,26 ppm). Ekstraktet hadde også sterke signaler i aromat- og olefinområdet. Signalene ved 3,2-4,5 ppm stammet trolig fra oksygenerte alifatiske protoner. Spektrene hadde også signaler fra etylacetatrester.

Vannfasene fra blad, blomst, rot og stengel rækstrakt

¹H- NMR-spektrumet til vannfasene syntes i hovedsak å inneholde karbohydrater, og dette ble sett på som uinteressant i denne sammenheng (NMR-spektrum 25-28).

6.2.2 Utbytte av ekstrakter og bioassay

Stoffer i rækstraktet ble fordelt mellom ulike faser. Mengde utbytte av ekstraktene økte med økende polaritet av løsningsmidler, unntatt for stengel etylacetatekstrakt som hadde minst stoffmengde blant ekstraktene. Vannfasene til rækstraktene var klart de største fraksjonene, men det var kun en del av dem som ble dampet inn til tørrhet. Dette gjaldt vannfasene til rækstraktene blad, rot og stengel. Grunnen til dette var vanskelighet med overkoking og kraftig skumming. Dette kunne tyde på at vannfasene inneholdt mye overflateaktive stoffer. Oversikt over utbytte av ekstrakter og resultater fra DPPH- og 15-LO-test er vist i Tabell 6.2.1.

Tabell 6.2.1 Oversikt over utbytte, DPPH-scavenging og 15-LO hemming av ekstrakter fra ulike deler av *S. canadensis*

Type ekstrakter	IC ₅₀ (µg/ml)		Utbytte av ekstrakter (g)
	DPPH-scavenging	15-LO hemming	
Blad rækstrakt	50,2±0,7	59±8	105,3
Blad diklormetan (DCM)	>167	43±3	7,3
Blad etylacetat (EtOAc)	10,3±0,4	22±3	9,6
Blad butanol (BuOH)	16,6±0,4	29±2	22
Blad vann	52±2	80±10	rest
Blomst rækstrakt	33±2	44±5	48,2
Blomst DCM	>167	36±4	1,2
Blomst EtOAc	17,9±0,6	32±3	1,6
Blomst BuOH	28±1	31±4	14,7
Blomst vann	114±4	>167	26,8
Rot rækstrakt	98±1	32±3	20,9
Rot organisk fase (DCM-EtOAc)	>167	27±3	3,6
Rot vannfase	55±5	114±7	16,4
Stengel rækstrakt	112±6	84±12	19,2
Stengel DCM	>167	38±4	1,5
Stengel EtOAc	25,2±0,4	25±2	1,1
Stengel BuOH	85±5	36±3	6,5
Stengel vann	>167	>167	rest

Rød farge = meget sterk aktivitet, blå farge = moderat aktivitet

Tabellen viste at de fleste polare organiske ekstraktene hadde høyere radikalscavenger-aktivitet enn de upolare ekstraktene, som var nærmest inaktive. Stengel vannekstrakt viste seg også å være inaktiv. De mest potente ekstraktene var blad etylacetat, blad butanol og blomst etylacetat med IC_{50} -verdier på henholdsvis $10,3 \pm 0,4$, $16,6 \pm 0,4$ og $17,9 \pm 0,6$ $\mu\text{g/ml}$. Blomst butanolekstrakt og stengel etylacetatekstrakt viste også høye radikalfangende aktivitet, men de var noe mindre potente. Radikalfangeraktiviteten til de fleste ekstrakter var konsentrasjonsavhengig. Med hensyn på hemming av 15-LO enzymet viste det seg også her at de fleste ekstrakter var aktive, og aktiviteten var konsentrasjonsavhengig. Vannekstraktene til råkstraktene var minst aktive, mens det helt klart mest aktive ekstraktet var blad etylacetat med en IC_{50} -verdi på 22 ± 3 $\mu\text{g/ml}$. Ekstraktene stengel etylacetat, rot organisk fase og blad butanol hadde også høye aktiviteter med IC_{50} -verdier på henholdsvis 25 ± 2 , 27 ± 3 og 29 ± 2 $\mu\text{g/ml}$.

Alle verdier i Tabell 6.2.1 var statistisk signifikante. For mer detaljerte opplysninger om resultatene fra DPPH- og 15-LO-test, se Tabell 1.2.3-1.2.10 i vedleggsdelen.

Som nevnt tidligere i avsnitt 6.1.3 Bioassay, var det blomst råkstraktet som viste høyest radikalfangende evne blant råkstraktene, mens det var rot råkstraktet som var best til å hemme 15-LO. Etter at stoffene i råkstraktene hadde blitt fordelt mellom ulike faser, ble det påvist at det var blad etylacetat ekstraktet som var mest potent både i DPPH- og 15-LO-testen. Dette kan skyldes at de aktive substansene i blomst råkstrakt fordeler seg over et større polaritetsområde enn substansene i blad råkstrakt. Synergistiske effekter kan også spille inn. I tillegg vil også usikkerheten og unøyaktigheten i vekta ved innveining være av betydning. Samme forklaring gjaldt også for rot råkstrakt med hensyn på hemming av 15-LO.

Fordi blad etylacetat ekstrakt hadde mye stoff og viste seg å ha både høyest radikalfangende evne og 15-LO hemmingsaktivitet, ble dette ekstraktet valgt ut til videre arbeid. NMR-spektrene av dette ekstraktet viste tydelige signaler i det aromatiske / olefiniske områder. Stengel etylacetat ekstrakt hadde også en meget høy aktivitet både som radikalfanger og som 15-LO-hemmer. Dets IC_{50} -verdi i DPPH-testen var $25,2 \pm 0,4$ $\mu\text{g/ml}$, mens i 15-LO-test var den på 25 ± 2 $\mu\text{g/ml}$. Av denne grunn var dette ekstraktet interessant, men det ble likevel ikke valgt ut til videre opprensing. Dette på grunn av at ekstraktet hadde for liten stoffmengde. Rot organisk ekstrakt derimot hadde en relativ stor stoffmengde og det hadde en betydelig

hemmingsaktivitet på 15-LO. I tillegg viste NMR-spektrene at det hadde signaler som var antatt å være terpenoider. Alle de nevnte grunnene talte derfor for at rot organisk ekstrakt ble valgt ut til videre rensing.

6.3 Blad etylacetat ekstrakt

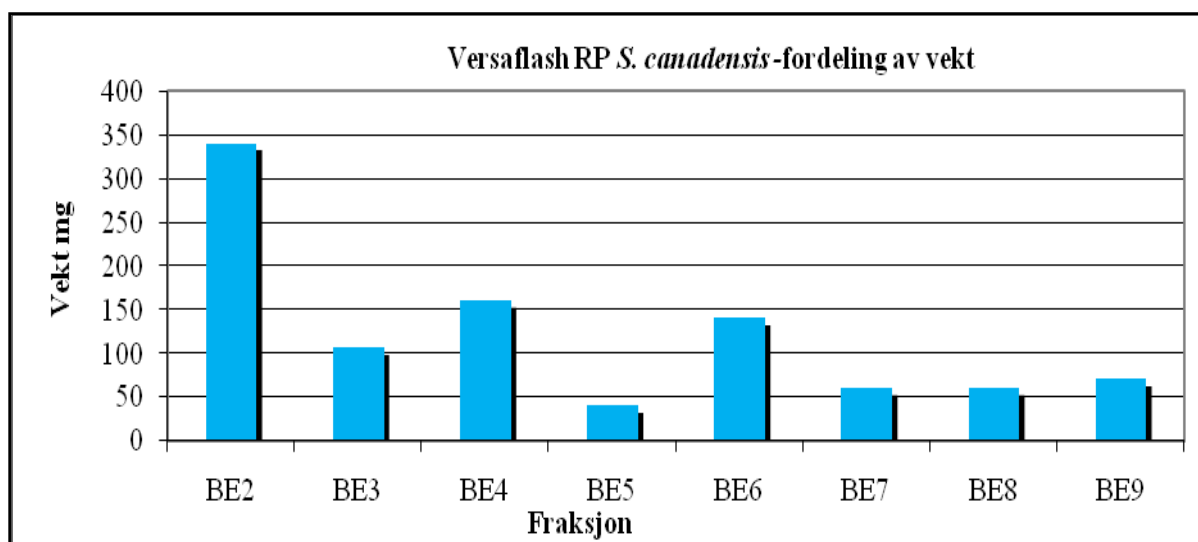
6.3.1 Fraksjonering av blad etylacetat ekstrakt

For oversikt over fraksjonering av blad etylacetat ekstraktet (BE) og videre arbeid med de opparbeidede fraksjonene, se Flytskjema 1.1.5 i vedleggsdelen.

VersaFlash kolonneparasjon

Blad etylacetat ekstraktet (BE) ble kromatografert på en omvendt fase C₁₈ kolonne. De mest polare forbindelsene ble eluert ut først, mens de påfølgende fraksjonene inneholdt stoff som hadde en gradvis reduksjon i polaritet. Det ble samlet opp 55 kolonnefraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene BE1-BE9 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying. Det samlede utbyttet var 4,5 g (79 %). Tapet av stoff kunne skyldes at en del av stoffene kunne ha sittet igjen i kolonnen eller at de befant seg i fraksjonen som ble vasket ut av kolonnen helt til slutt. Denne fraksjonen ble kastet, grunnet den kunne inneholde mye uinteressante stoffer. Det var BE1 og BE2 som hadde størst utbytte (Tabell 1.2.12 i vedleggsdelen).

Figur 6.3.1 viser utbytte av fraksjonene grafisk.



Figur 6.3.1 Utbytte av fraksjoner fra BE (RP= omvendt fase (reverse phase))

NMR-spektroskopi

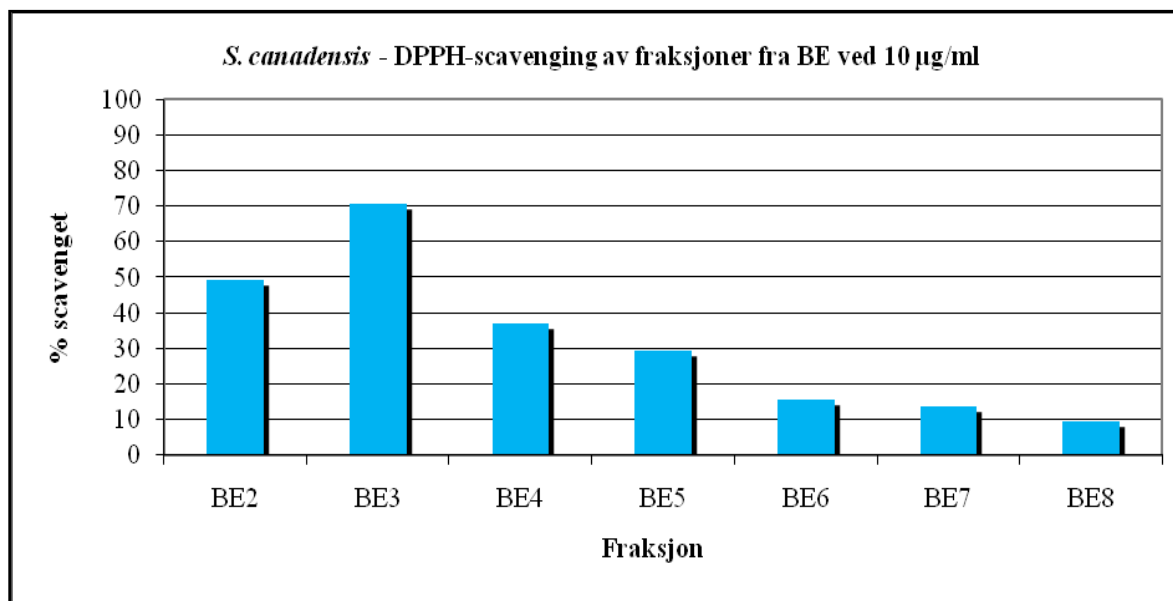
Det ble tatt både ^1H - og ^{13}C -NMR-spektre av alle fraksjoner, unntatt BE1 hvor det ble kun tatt ^1H -NMR-spektrum. Det var spektrene til fraksjonene BE1-BE4 som så mest interessant ut og de liknet på hverandre. De inneholdt aromatiske- og olefiniske signaler som trolig stammet fra flavonoider, hvor signalene ved 6,0-8,0 ppm kom sannsynligvis fra protoner på A- og B-ringen (Agrawal, 1989). I tillegg hadde fraksjonene en del signaler i området 3,3-4,2 ppm som kunne tyde på innhold av karbohydrater. Signalene ved 3,5-4,3 kunne stamme fra aromatisk metoksygruppe (Agrawal, 1989). Fraksjonene hadde også en del tydelige signaler i det alifatiske området som kunne komme fra fett og terpenoider. Det var fraksjon BE4 som hadde flest signaler i det nevnte området. De resterende fraksjonene BE5-BE9 hadde minkende signaler i aromat- og olefinområdet. Dette kunne tyde på at innholdet av flavonoider var minkende jo seinere fraksjonene kom ut av kolonnen ved VersaFlash kolonneseparesjon.

^1H -NMR-spektrumet til BE1 viste at det inneholdt mye av det samme som det opprinnelige BE ekstrakt. En mulig forklaring for dette var som følgende: Ved kromatografering var start eluenten 50 % vandig metanol, mens BE var løst i ren metanol. Starteluenten klarte ikke å fortynne den sterke prøveløsningen. Derfor fulgte meste parten av prøven nedover med fronten. Det var kun en del som ble holdt igjen i kolonnen og ble eluert på vanlig måte. På denne måten ble fronten nærmest lik utgangsstoffet, og ble kalt for ”gjennombruddsfraksjon”.

Bioassay

Fraksjonene BE2-BE8 ble testet for radikalscavenging ved konsentrasjon på 10 $\mu\text{g/ml}$ (Tabell 1.2.13 i vedleggsdelen). Det var fraksjon BE3 som hadde høyest radikalfangende evne, deretter kom BE2. For de andre fraksjonene var grad av scavenging minkende med økende fraksjonsnummer. Dette kunne tyde på at innholdet av flavonoider i disse fraksjonene var minkende, og dette stemte godt med det som var funnet i NMR-spektrene.

Figur 6.3.2 viser resultatene av DPPH-testen grafisk.



Figur 6.3.2 Radikalfangende aktivitet for fraksjoner fra BE

Av alle fraksjoner veide BE1 mest og det inneholdt interessante signaler i aromat- og olefinområdet i NMR-spekteret. Ved fraksjonering av BE var det BE2 som veide mest etter BE1, men den var så liten at fraksjon BE1 ble valgt ut til videre arbeid.

Krystallisasjon

Ved henstand over natt ved romtemperatur ble det dannet krystaller i fraksjon BE3.

Krystallene fra BE3 var sitrongule, porøse og hadde liten kornstørrelse.

Krystallisasjon oppstod når et løst stoff felte seg ut som krystaller fra en løsning av stoffet. Den kunne bli betraktet som et resultat av tre suksessive prosesser: overmetning av løsningen, dannelse av krystallkjerner og krystallvekst rundt kjernen (Florence *et al.*, 2004). For at krystallisasjon skulle komme i stand, måtte konsentrasjonen av stoffet i løsning overskride løseligheten. Dette betydde at løsningen måtte være overmettet (Norsk kjemisk selskap, 2008). Det var altså dette som skjedde i fraksjon BE3. Overmetning eller dannelse av krystaller fra fraksjon BE3 skjedde muligens på grunn av (Aulton, 2002), (Florence *et al.*, 2004), (Pedersen, 1998):

- Inndamping
 - Fraksjon BE3 var oppløst i metanol og ble satt til delvis inndamping ved romtemperatur. På denne måten ble løsningen til denne fraksjonen mer konsentrert og etter hvert overmettet.

- Avkjøling
 - Løseligheten (solubility) av et fast stoff var definert som den maksimale mengden av stoffet som lot seg løse i løsemidlet. Løsningen var da mettet, og løseligheten var avhengig av temperatur. De fleste stoffer ble mindre løselig når temperaturen ble redusert og dette ville føre til en overmetning. Derfor ble fraksjon BE3 plassert på kjølerom for avkjøling og dermed bedring av utkrystallisering.
- Tilsetning av løsemiddel
 - ved tilsetning av løsemiddelet metanol til fraksjon BE3 ble løsningen uklar, og dette indikerte at forbindelsen i denne fraksjonen var dårlig løselig i metanol. Dette var med på å bedre utkrystalliseringen.

NMR-spektroskopi

Krystaller og supernatant fra BE3 ble analysert ved ^1H -NMR spektroskopi. Spektrumet av utkrystallisert stoff viste skarpe signaler i aromatområdet som kunne tyde på innhold av flavonoider. Signalmønsteret tydet på at det utkrystalliserte stoffet inneholdt en stor mengde av et flavonoid med 3,5,7,3',4'-oksygensubstitusjon (quercetintype). I tillegg viste spektrumet en del signaler som kunne tyde på innhold av karbohydrater. Karbohydratet var ikke rhamnose, siden dubletten fra rhamnose-H6 ikke var tilstedet i spektrumet. Sammenligning med litteraturdata viste det at aglykondelen stemte godt overrens med både quercetin 3-glukosid og quercetin 3-galaktosid. Begge disse var tidligere rapportert i *S. canadensis*. Karbohydratsignalene stemte dårlig overrens med litteraturen. Dette kunne gi en pekepinn på at forbindelsen i det utkrystalliserte stoffet ikke var noen av de nevnte forbindelsene og at forskjellen lå i karbohydratdelen. Spektrumet til det utkrystalliserte stoffet hadde også et stort signal ved ca. 1,8 ppm, og det var usikkert hvor det stammet fra.

Quercetin 3-(6-O-acetyl)-glukosid var tidligere blitt rapportert i *S. canadensis* var. *glabra*. En ny sammenligning med NMR-data av den nevnte forbindelsen viste en god overensstemmelse mellom spektraldataene. Dette resultatet kunne forklare signalet ved 1,8 ppm som kom fra metyldelen til acetylgruppen. Ut fra dette kunne det antas at det isolerte stoffet var quercetin 3-(6-O-acetyl)-glukosid, men dette stoffet var ikke helt rent. Spektrumet viste flere sett med signaler som tydet på innhold av flere forbindelser i blanding. Singlettsignalet ved 3,83 ppm kom trolig fra en metoksygruppe (OCH_3) som kunne indikere innhold av isorhamnetin-

derivat (Carollo *et al.*, 2006), mens en dublett ved 8,03 ppm tydet på at et kaempferolderivat (Hungria *et al.*, 1991) også var tilstede i det utkrystalliserte stoffet.

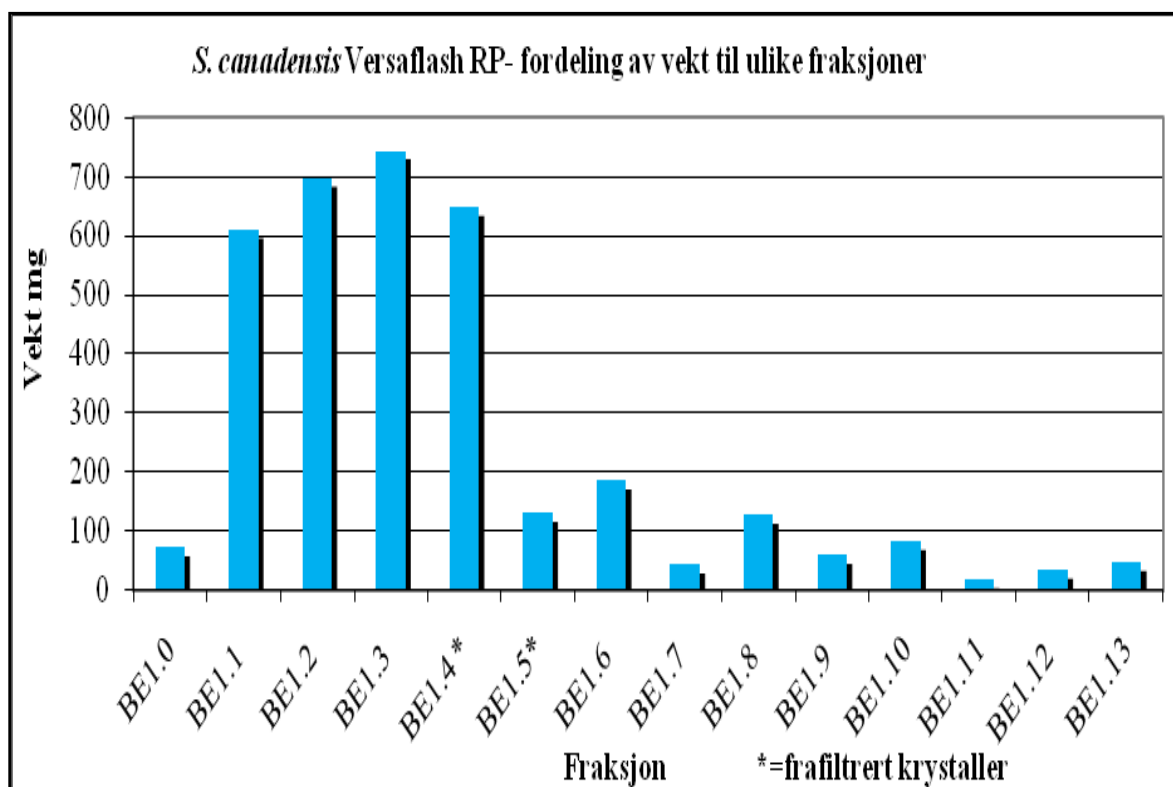
Acetylglukosider av isorhamnetin og kaempferol er tidligere rapportert i *S canadensis* (Budzianowski *et al.*, 1990).

¹H-spektrumet til supernatanten viste seg å inneholde mye av det samme som krystallene. Det så ut til at supernatanten innholdt mye mer quercetin-3-(6-O-acetyl)-gluksid enn krystallene, mens innholdet av isorhamnetinderivat og kaempferolderivat var blitt mindre i supernatanten.

6.3.2 Fraksjonering av BE1

VersaFlash kolonneseparasjon

Fraksjon BE1 ble kromatografert på en omvendt fase C₁₈ kolonne. Det ble samlet opp 40 kolonnefraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene BE1.0-BE1.13 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying. Det samlede utbyttet var 3,56 g (106 %) (Tabell 1.2.15 i vedleggsdelen). Grunnen til at utbytte ble litt over 100 % var muligens at den siste mobilfasen som ble pumpet gjennom kolonnen var ren metanol, og den hadde eluert ut stoffer som hadde sittet igjen i kolonnen fra tidligere bruk. Det høye utbyttet kunne også skyldes at fraksjonene ikke var helt tørre ved innveining. Utbytte av fraksjonene er framstilt grafisk i Figur 6.3.3.



Figur 6.3.3 Utbytte av fraksjoner fra BE1 (RP= omvendt fase (reverse phase))

NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner fra BE1 ble analysert både ved ^1H - og ^{13}C -NMR-spektroskopi. Ut fra NMR-spektrene så var fraksjonene BE1.0-BE1.8 som hadde de mest interessante signalene. Fraksjon BE1.0 hadde et signalmønster som kunne tyde på innhold av kaffeoylkinasyrederivater. Fraksjon BE1.1 liknet på fraksjon BE1.0, men den hadde et singlettsignal ved 1,8 ppm som kunne tyde på innhold av quercetin-3-(6-O-acetyl)-glukosid.

NMR-spektrene til fraksjonene BE1.2-BE1.6 var ganske like, og inneholdt hovedsakelig quercetin-acetylglukosid. I tillegg hadde spektrene signaler ved 3,8 ppm og 8,0 ppm som kunne tyde på innhold av henholdsvis isorhamnetin- og kampferolderivater.

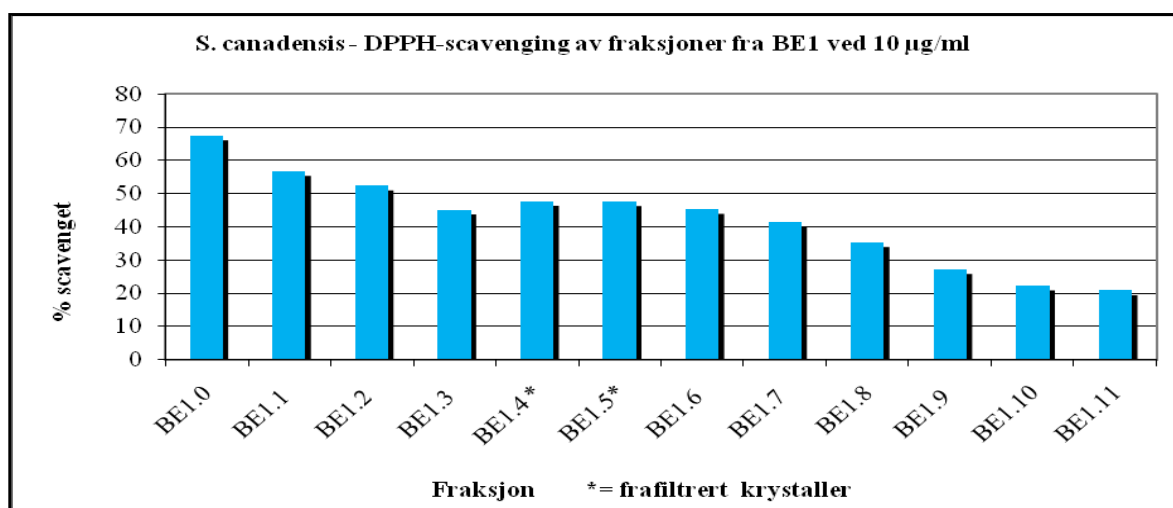
NMR-spektrene til fraksjon BE1.7 og BE1.8 viste innholdet av like mengder av kaempferol og quercetin. De inneholdt også signaler fra karbohydrater, litt fett og terpenoider.

Bioassay

Fraksjonene BE1.0-BE1.11 ble testet for radikalscavenging ved konsentrasjon på 10 $\mu\text{g/ml}$ (Tabell 1.2.16 i vedleggsdelen). Det var fraksjon BE1.0 som hadde høyest radikalfangende

evne, deretter var grad av scavenging minkende med økende fraksjonsnummer. Aktiviteten var forholdsvis stabil fra fraksjon BE1.2-BE1.8, og deretter sank den noe mer. Fraksjon BE1.3 hadde noe lavere aktivitet enn fraksjonene BE1.4-BE1.6. Dette kunne skyldes at konsentrasjonen til BE1.3 var usikker, og at den sanne konsentrasjonen kunne være mindre enn det som var oppgitt. Siden det var en relativ jevn reduksjon i radikalfangende aktivitet til fraksjonene, ville det derfor være fornuftig å forvente at BE1.3 ville ha hatt høyere aktivitet dersom den hadde riktig konsentrasjon.

Resultater av DPPH-testen framstilles grafisk i Figur 6.3.4.



Figur 6.3.4 Radikalfangende aktivitet

Som nevnt tidligere var det fraksjonene BE1.0-BE1.2 som hadde høyest radikalfangende aktivitet, men BE1.0 hadde liten stoffmengde. Fraksjonene BE1.1 og BE1.2 hadde mye stoff og NMR-spektrene tydet på innhold av dicaffeoylkinasyrederivater og andre fenoliske forbindelser. På bakgrunn av dette ble de fraksjonert videre.

Krystallisasjon

Det ble isolert krystaller fra følgende fraksjoner: kolonnefraksjonene 5-17 og 22-26, BE1.0, BE1.3-BE1.5 og BE1.7 og fra krystallene fra kolonnefraksjoner 5-17 (2. utkrystallisering) og 22-26 (2. utkrystallisering). De observerte krystallene fra fraksjonene var gule og kompakte.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spektrum av utkrystallisert stoff fra kolonnefraksjonene 5-17 hadde et mønster av signaler som liknet på quercetin. Det viste at stoffet inneholdt quercetin etter sammenligning med litteraturdata, men spektrumet var ikke helt tydelig. Dette var på grunn av at forbindelsen var løst i metanol, og quercetin hadde dårlig løselighet i dette løsemiddelet. Derfor hadde den felt seg ut. Fast stoff fra 2. utkrystallisering av kolonnefraksjonene 5-17 viste et godt spektrum som kunne tyde på innhold av ren quercetin.

¹H-NMR-spektrum til utkrystallisert stoff fra kolonnefraksjonene 22-26 hadde et signalmønster som minnet om kaempferol. En sammenligning med litteraturdata kunne bekreftes at forbindelsen i det krystallinske stoffet var kaempferol, men den var ikke ren. Krystallinsk stoff fra 2. utkrystallisering av kolonnefraksjonene 22-26 hadde et signalmønster som liknet på isorhamnetin. Ved sammenligning med litteraturdata viste det seg at forbindelsen i det krystallinske stoffet var relativt ren isorhamnetin.

Utkrystallisert stoff fra fraksjon BE1.0 ble analysert ved ¹H-NMR-spektroskopi og hadde signaler som kunne tyde på innhold av klorogensyre og kinasyre. Forbindelsen i det utkrystalliserte stoffet ble identifisert som 3,5-dikaffeoylkinasyre etter sammenligning med litteraturdata.

¹H-NMR-spektrumet til det krystallinske stoffet fra BE1.3 og BE1.4 inneholdt hovedsakelig quercetin-3-(6-O-acetyl)-glukosid. Den inneholdt også en liten mengde av kaempferol eller et kaempferolderivat.

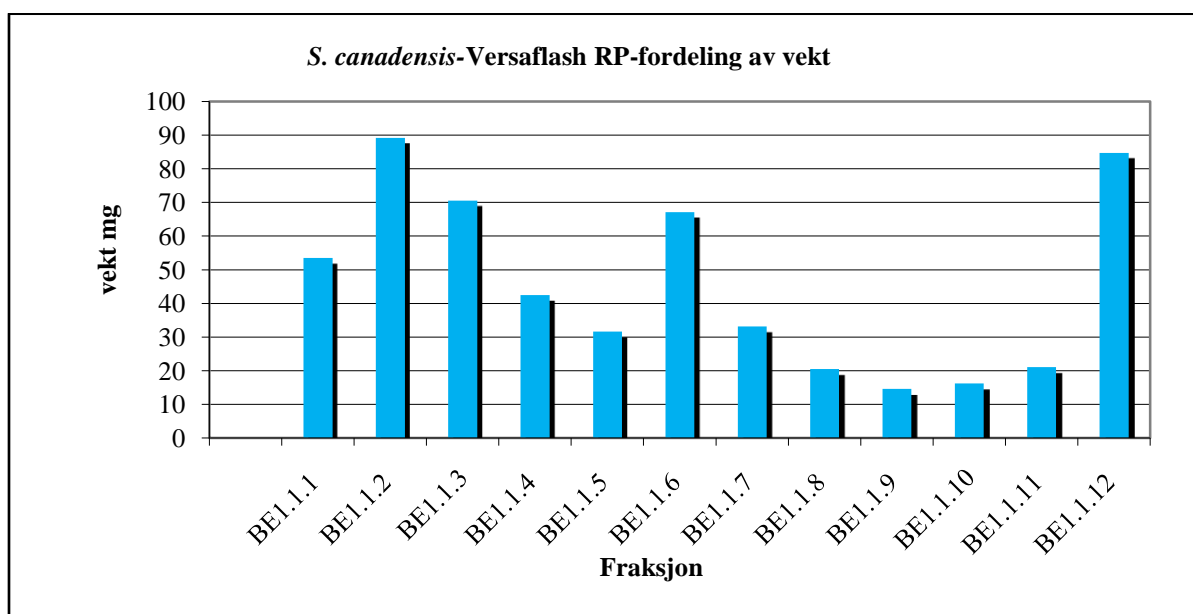
Utkrystallisert stoff fra fraksjon BE1.5 var meget rent og ble identifisert som quercetin. Supernatanten til BE1.5 viste en blanding av mange forbindelser, de mest dominerende var kaempferol, isorhamnetin og quercetin.

Det krystallinske stoffet fra BE1.7 ble anslått å inneholde ca 60 % isorhamnetin, 25 % kaempferol og 15 % andre forbindelser.

6.3.3 Fraksjonering av BE1.1

VersaFlash kolonnekolonneeparasjon

BE1.1 ble kromatografert på en omvendt fase C₁₈ kolonne. Det ble samlet opp 40 kolonnefraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene BE1.1.1-BE1.1.12 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying. Det samlede utbyttet var 0,54 g (89 %). Tap av stoff kunne skyldes de samme grunnene som nevnt i avsnitt 6.3.1 Fraksjonering av blad etylacetat ekstrakt. Fraksjonene BE1.1.2 var den største, fulgt av fraksjon BE1.1.12 (Tabell 1.2.18 i vedleggsdelen). Utbytte av fraksjonene er framstilt grafisk i Figur 6.3.5.



Figur 6.3.5 Utbytte av fraksjoner fra BE1.1

NMR-spektroskopi

NMR-spektrene til fraksjonene BE1.1.2 og BE1.1.3 var like og viste innhold av 3,5-dicaffeoylkinasyre.

Fraksjonene BE1.1.4-BE1.1.6 var også like og viste innhold av mange forbindelser i blanding. De mest dominerende stoffene var trolig quercetin-3-(6-O-acetyl)-glukosid, isorhamnetin og et eller flere kaffeoylkinasyrederivater.

NMR-spektrene til fraksjon BE1.1.7 hadde signaler som tydet på innhold av flavonoider, stort sett quercetin-3-(6-O-acetyl)-glukosid.

Krystallisasjon

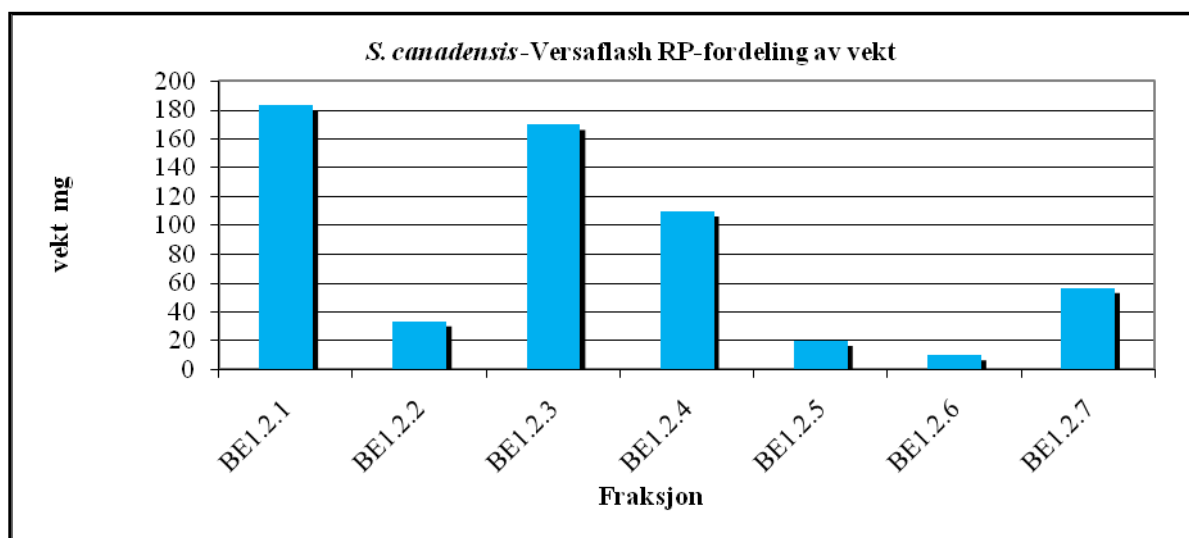
Det ble isolert krystaller fra fraksjon BE1.1.7.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spektrumet av utkrystallisert stoff fra BE1.1.7 viste innhold av ren quercetin-3-(6-O-acetyl)-glukosid.

6.3.4 Fraksjonering av BE1.2**VersaFlash kolonne separasjon**

BE1.2 ble kromatografert på en omvendt fase C₁₈ kolonne. Det ble samlet opp 33 kolonnefraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene BE1.2.1-BE1.2.7 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying. Det samlede utbyttet var 0,58 g (89 %) (Tabell 1.2.20 i vedleggsdelen). Tap av stoff kunne skyldes de samme grunnene som nevnt i avsnitt 6.3.1 Fraksjonering av blad etylacetat ekstrakt. Utbytte av fraksjonene er grafisk framstilt ved Figur 6.3.6.



Figur 6.3.6 Utbytte av fraksjoner fra BE1.2

NMR-spektroskopi

NMR-spektrene til fraksjon BE1.2.1 viste et signalmønster som tydet på innhold av 3,5-dikaffeoylkinasyre, men den var ikke helt ren.

Fraksjon BE1.2.2 hadde signaler som indikerte at fraksjonen inneholdt en blanding av flavonoider og kaffeoylkinasyrederivater. Et singlettsignal ved ca 1,8 ppm indikerte at flavonoidet i denne fraksjonen var hovedsakelig quercetin-3-(6-O-acetyl)-glukosid.

Fraksjonene BE1.2.3-BE1.2.6 var relativt like og viste innhold for det meste av quercetin-3-(6-O-acetyl)-glukosid og en del kaempferol eller derivat av kaempferol. Det var fraksjon BE1.2.3 som tilsynelatende inneholdt minst kaempferol.

Krystallisasjon

Det ble isolert krystaller fra fraksjonene BE1.2.3 og BE1.2.4.

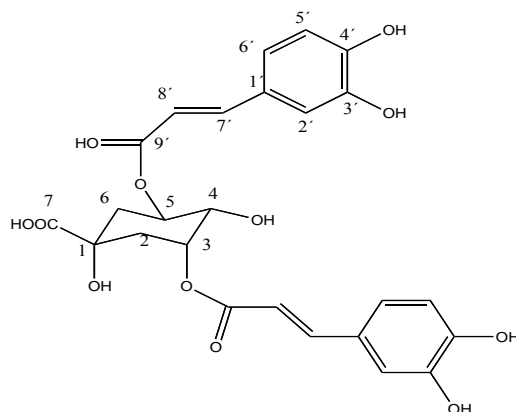
NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spektrene til utkrystallisert stoff fra fraksjonene BE1.2.3 indikerte innhold av ren quercetin 3-(6-O-acetyl)-glukosid. Det utkrystalliserte stoffet fra fraksjon BE1.2.4 inneholdt også quercetin 3-(6-O-acetyl)-glukosid, men var ikke ren. I tillegg inneholdt det også en liten mengde kaempferol.

6.3.5 Isolerte krystallinske forbindelser fra BE

6.3.5.1 3,5-dikaffeoylkinasyre

3,5-dikaffeoylkinasyre danner blekt gule krystaller. Forbindelsen er et kaffeoylkinasyre derivat (Tatefuji *et al.*, 1996), (Pauli *et al.*, 1999). Dette er første gang 3,5-dikaffeoylkinasyre ble funnet i bladene. Forbindelsen var ikke oppdaget i *S. canadensis* tidligere på det tidspunktet da den ble identifisert i denne oppgaven, men ble nylig rapportert funnet i blomstene (Bradette-Hebert *et al.*, 2008).



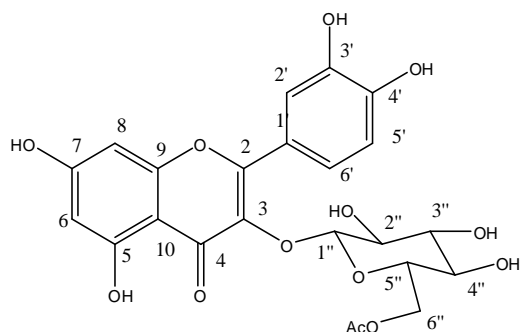
Figur 6.3.7 Molekylstruktur for 3,5-dikaffeoylkinasyre

NMR-spektroskopi

NMR-dataene til fraksjonene BE1.0, BE1.1.2 og BE1.1.3 (NMR-spektrum 29-30) ble sammenlignet med data funnet i litteratur for 3,5-dikaffeoylkinasyre (Tatefuji *et al.*, 1996). Det var overensstemmelse mellom disse (Tabell 1.2.33).

6.3.5.2 6''-O-acetyl-isoquercitrin

6''-O-acetyl-isoquercitrin (quercetin-3-(6-O-acetyl)-glukosid) er et sitrongult pulver og har blitt funnet i *S. canadensis* tidligere. Forbindelsen er et flavonolglukosid som består et aglykon av typen quercetin og glukose hvor en acetylgruppe er bundet til C6 i glukosen (Budzianowski *et al.*, 1990).



Figur 6.3.8 Molekylstruktur for 6''-O-acetyl-isoquercitrin (Chebil *et al.*, 2007)

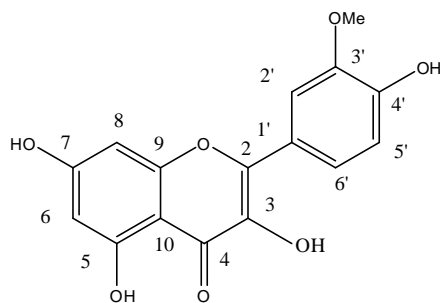
NMR-spektroskopi

Utkrystalliserte stoffer fra fraksjonene BE3, BE1.3, BE1.4, BE1.1.7, BE1.2.3 og BE1.2.4 (NMR-spektrum 31-32) ble identifisert som 6''-O-acetyl-isoquercitrin, og identifiseringen ble utført som beskrevet i avsnitt 6.3.5.1 3,5-dikaffeoylkinasyre (Tabell 1.2.34).

6.3.5.3 Isorhamnetin

Isorhamnetin danner lysegule krystaller og kalles også for quercetin 3'-metyl eter.

Forbindelsen tilhører subfamilien flavonoler og er funnet i planten tidligere (Budzianowski *et al.*, 1990).



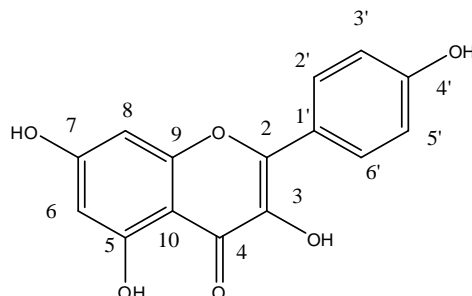
Figur 6.3.9 Molekylstruktur for isorhamnetin (Carollo *et al.*, 2006)

NMR-spektroskopi

Utkrystalliserte stoff fra 2. utkrystallisering av kolonnefraksjonene 22-26 ble identifisert som isorhamnetin, og identifiseringen ble utført som beskrevet i avsnitt 6.3.5.1 3,5-dikaffeoylkinasyre (Tabell 1.2.35) (NMR-spektrum 33-34).

6.3.5.4 Kaempferol

Kaempferol er et lysegult pulver og tilhører subfamilien flavonoler. Forbindelsen har blitt funnet i planten tidligere (Budzianowski *et al.*, 1990).



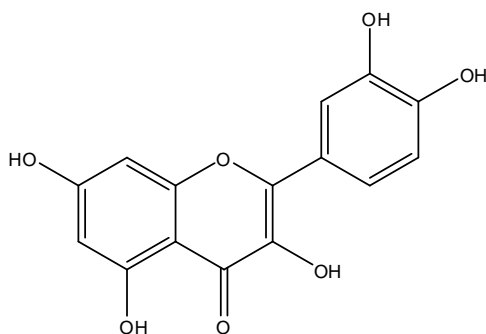
Figur 6.3.10 Molekylstruktur for kaempferol (Nest *et al.*, 2004)

NMR-spektroskopi

Utkrystalliserte stoff fra 1. utkrystallisering av kolonnefraksjonene 22-26 ble identifisert som kaempferol, og identifiseringen ble utført som beskrevet i avsnitt 6.3.5.1 3,5-dikaffeoylkinasyre (Tabell 1.2.36) (NMR-spektrum 35-36).

6.3.5.5 Quercetin

Quercetin er et lysegult pulver og har lenge vært kjent som en potent antioksidant. Forbindelsen tilhører subfamilien flavonoler og er funnet i planten tidligere (Budzianowski *et al.*, 1990).



Figur 6.3.11 Molekylstruktur for quercetin

NMR-spektroskopi

Utkrystalliserte stoffer fra kolonnefraksjoner 5-17 og fraksjon BE1.5 og ble identifisert som quercetin, og identifiseringen ble utført som beskrevet i avsnitt 6.3.5.1 3,5-dikaffeoylkinasyre (Tabell 1.2.37) (NMR-spektrum 37-38).

6.3.6 Bioassay

Forbindelsene isorhamnetin, 3,5-dikaffeoylkinasyre, 6''-O-acetyl-isoquercitrin, kaempferol og quercetin ble testet for DPPH-scavenging og 15-LO-inhibering. Ved utførelse av testene ble det benyttet kommersiell kaempferol (Sigma). Dette var på grunn av at stoffmengden til isolert kaempferol var for liten, og den var heller ikke 100 % ren.

Resultater av DPPH-testen ble som vist i Tabell 6.3.1.

Tabell 6.3.1 DPPH-test av isolerte stoffer

Isolerte stoffer	% scavenging IC_{50} (μM)
Isorhamnetin	7,8 \pm 0,6
3,5-dikaffeoylkinasyre	9,1 \pm 0,3
6''-O-acetyl-isoquercitrin	18,5 \pm 0,3
Kaempferol	21,5 \pm 1,5
Quercetin	9,0 \pm 0,4

Alle forbindelser viste høye radikalfangende aktiviteter som var doseavhengige. Det var kaempferol som hadde lavest aktivitet blant de fem forbindelsene, mens det var isorhamnetin

som åpenbart var den mest aktive forbindelsen med en IC_{50} -verdi på $7,8 \pm 0,6 \mu M$. Til sammenligning hadde quercetin en IC_{50} -verdi på $9,0 \pm 0,4 \mu M$, dermed er isorhamnetin mer potent enn quercetin som lenge hadde vært kjent som en potent antioksidant. 3,5-dikaffeoylkinasyre derimot var nesten like aktivt som quercetin, mens aktiviteten til 6"-O-acetyl-isoquercitrin var en del lavere.

Resultatene av 15-LO test ble som vist i Tabell 6.3.2.

Tabell 6.3.2 15-LO test av isolerte forbindelse

Isolerte stoffer	15-LO $IC_{50} (\mu M)$
Isorhamnetin	19 ± 2
3,5-dikaffeoylkinasyre	46 ± 2
6"-O-acetyl-isoquercitrin	48 ± 2
Kaempferol	42 ± 2
Quercetin	36 ± 4

Isorhamnetin ga en konsentrasjonsavhengig inhibering av 15-LO-aktivitet med en IC_{50} -verdi på $19 \pm 2 \mu M$. Også her var isorhamnetin mer potent enn quercetin som hadde en IC_{50} -verdi på $36 \pm 4 \mu M$. Forbindelsene 3,5-dikaffeoylkinasyre, 6"-O-acetyl-isoquercitrin og kaempferol var nesten like aktive, men hadde noe svakere aktivitet enn isorhamnetin og quercetin. Søk i ulike databaser viste at 6"-O-acetyl-isoquercitrin ikke tidligere har blitt testet for 15-LO.

Resultatene fra DPPH- og 15-LO-testen viste at det var quercetin og isorhamnetin som var de mest potente blant de isolerte forbindelsene. Dette skyldes deres unike strukturoppbygning som hadde en avgjørende betydning for scavenging og antioksidant virkningen (Paganga *et al.*, 1996), (Rice-Evans *et al.*, 1997). For mer informasjon om strukturelle forhold til flavonoidene, se avsnitt 4.4.1 Flavonoider i kapittel 4 Bakgrunn. Resultatene av testene viste også at isorhamnetin hadde høyere radikalfangende og enzymhemmende aktivitet enn quercetin. Dette stemte dårlig med det som var funnet i litteraturen. En studie utført i Korea med samme radikalfangende metode som i denne oppgaven, indikerte at quercetin hadde høyere antioksidant aktivitet enn isorhamnetin (Kim *et al.*, 2005). Isorhamnetin og quercetin er kun strukturelt forskjellig ved at isorhamnetin er O-metylert i C-3' posisjonen. Det at isorhamnetin ble påvist i denne oppgaven å ha høyere antioksidant aktivitet enn quercetin, kunne skyldes at konsentrasjon til isorhamnetin var usikker på grunn av små mengder stoff tilgjengelig. Den sanne konsentrasjonen kunne derfor ha vært høyere enn det som var oppgitt. Dermed kunne dette føre til feil beregning av IC_{50} -verdier. I tillegg ville renheten til

isorhamnetin også spille en avgjørende rolle. Det kunne tenkes at den isolerte mengden av isorhamnetin ikke var ren, og den kunne muligens ha inneholdt små mengder av kaempferol.

For mer detaljert informasjon om radikalfangende evne og 15-LO hemmingsaktiviteter til de ulike isolerte forbindelsene ved ulike konsentrasjoner, se Tabell 1.2.21 og 1.2.22. Quercetin ble benyttet som positiv kontroll i både DPPH- og 15-LO testen.

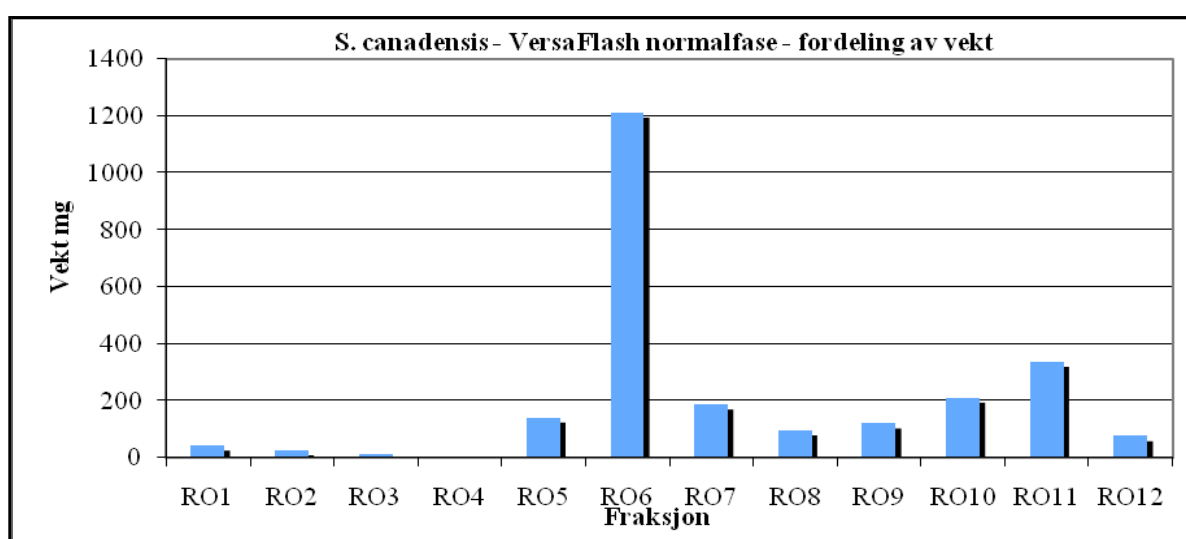
6.4 Rot organisk ekstrakt

6.4.1 Fraksjonering av rot organisk ekstrakt

For oversikt over fraksjonering av rot organisk ekstraktet (RO) og videre arbeid med de opparbeidede fraksjonene, se i Flytskjema 1.1.6-1.1.9 i vedleggsdelen.

VersaFlash kolonneseparasjon

RO ble kromatografert på en normalfase silikakolonne kolonne. Dette separerte stoffer hovedsakelig på grunnlag av polaritet, slik at de mest polare stoffene kom ut sist. Det ble samlet opp 101 kolonnefraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene RO1-RO12 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av spraying med ceric-reagens. Det samlede utbyttet var 2,48 g (75 %). Tap av stoff kunne skyldes de samme grunnene som nevnt i avsnitt 6.3.1 Fraksjonering av blad etylacetat ekstrakt. Det var fraksjonene RO6 som hadde størst utbytte (Tabell 1.2.24 i vedleggsdelen). Utbytte av fraksjonene ble grafisk framstilt i Figur 6.4.1.



Figur 6.4.1 Utbytte av fraksjoner fra RO

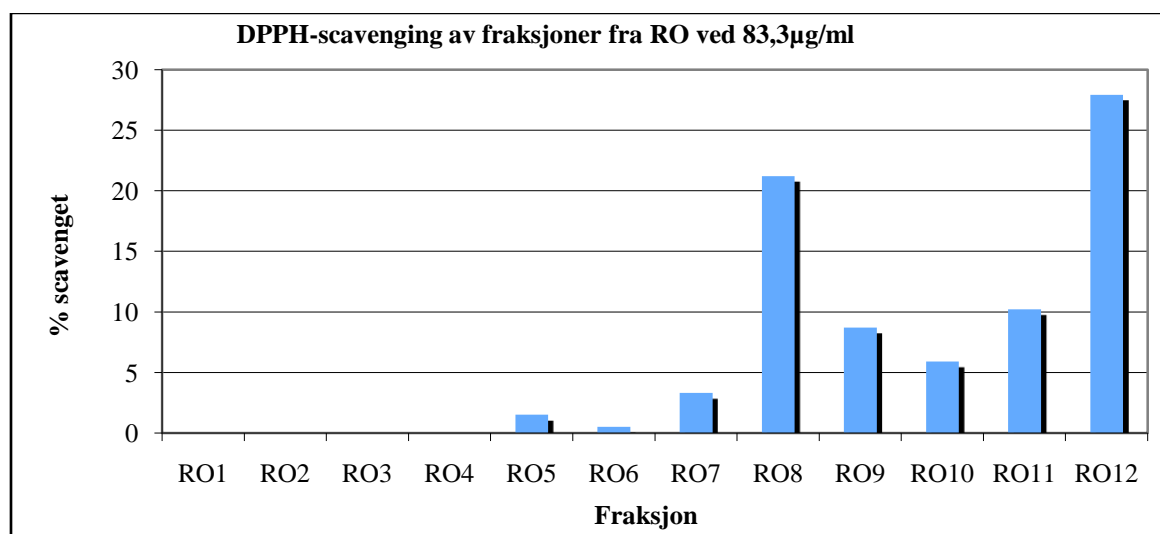
NMR-spektroskopi

Fraksjoner ble analysert ved hjelp av ^1H - og ^{13}C -NMR spektroskopi, med unntatt av fraksjonene RO1, RO3 og RO4 hvor det kun ble tatt opp ^1H -spektrum. Av alle fraksjoner var det fraksjonene RO2, RO6, RO7, RO10 og RO11 som så mest interessant ut. NMR-spektrene til de nevnte fraksjonene viste signaler i området 0,8-2,8 ppm som kunne tyde på at de var hovedsakelig terpenoider. I tillegg viste de også signaler som lignet på solidagenon, spesielt fraksjon RO2 og RO6. Fraksjon RO6, som krystalliserte spontant i lange hvite nåler ved inndamping, viste seg å være solidagenon ved sammenligning med NMR-data funnet i litteraturen. Ut fra NMR-spektret ble renheten anslått til 95 % eller bedre. Fraksjonene RO7, RO10 og RO11 hadde en del kompliserte signaler i tillegg til de signalene som var funnet for solidagenon. Dette kunne tyde på at de ikke inneholdt solidagenon, men de kunne sannsynligvis ha en solidagenon-liknende grunnstruktur. Dette tydet på at de alle var diterpener av labdan type (NMR-spektrum 39-48).

6.4.1.1 Bioassay

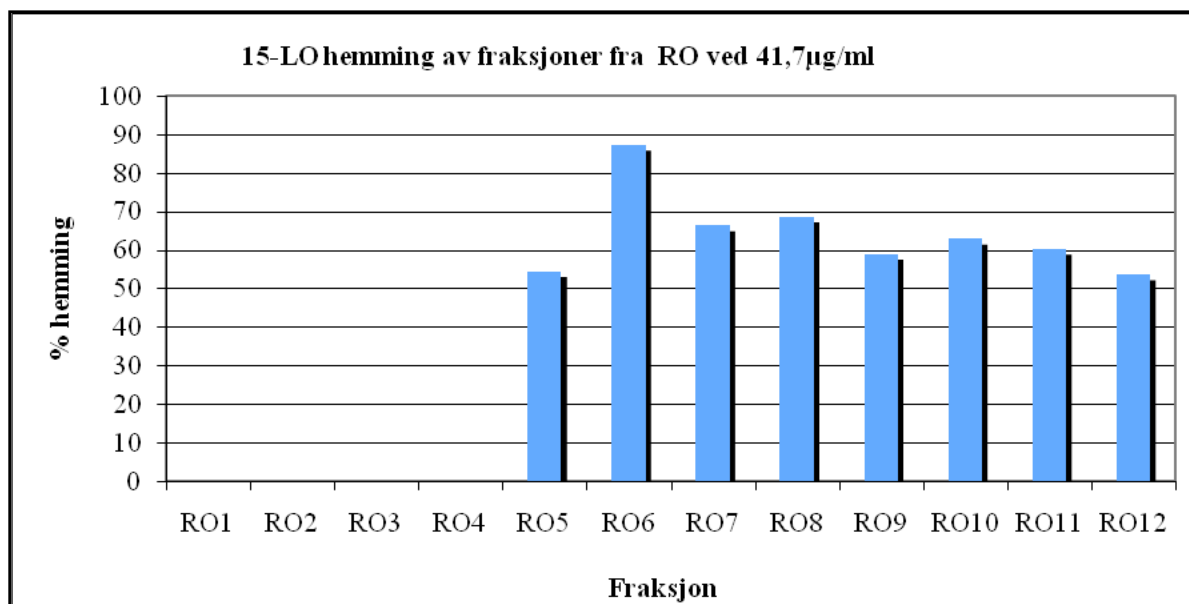
DPPH-test ble utført på solidagenon og fraksjonene RO5, RO7-RO12 ved forskjellige konsentrasjoner.

Alle fraksjoner inkludert solidagenon, hadde svært lave radikalscavengeraktivitet med IC_{50} -verdier over 167 $\mu\text{g/ml}$ (Tabell 1.2.25 i vedleggsdelen). Fraksjon RO12 var mest aktiv ved en konsentrasjon på 83,3 $\mu\text{g/ml}$ (Figur 6.4.2).



Figur 6.4.2 Radikalfangende aktivitet til fraksjoner fra RO

15-LO hemming ble også testet for solidagenon og fraksjonene RO5, RO7-RO12 ved ulike konsentrasjoner. Resultater viste at solidagenon hadde høyest hemmingsaktivitet av 15-LO med en IC_{50} -verdi på $20,6 \pm 1,7 \mu\text{g/ml}$ som tilsvarte $65 \mu\text{M}$ (molekylmassen til solidagenon = 316 g/mol). De andre fraksjonene var også aktive. Fraksjon RO5 hadde lavest aktivitet. IC_{50} -verdier til de nevnte fraksjonene var mellom $28,6\text{-}39 \mu\text{g/ml}$ (Figur 6.4.3 og Tabell 1.2.26 i vedleggsdelen).



Figur 6.4.3 Grad av enzymhemming av fraksjoner fra RO

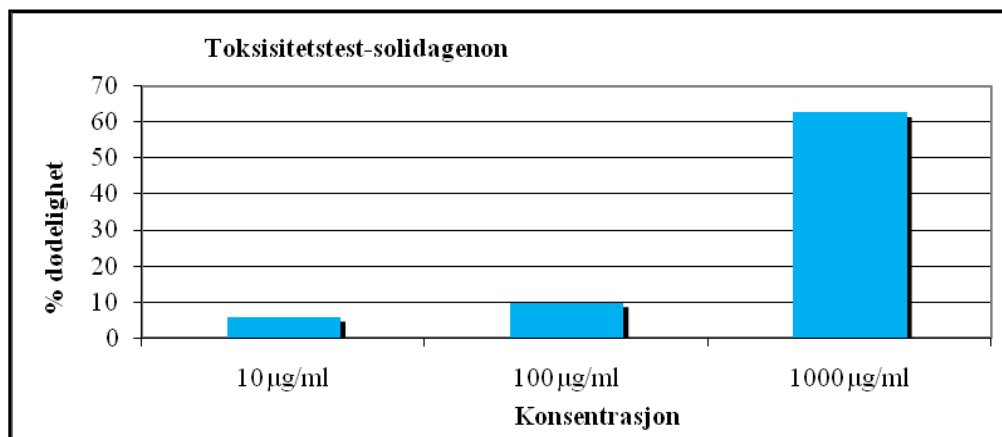
Det ble utført toksisitetstest på ren solidagenon. Ved tilsetning av saltvann til $50 \mu\text{l}$ prøveløsning av solidagenon, ble det dannet et melkehvitt bunnfall ved den høyeste konsentrasjonen. Dette skyldtes utfelling av solidagenon. Resultatet av testen ble som vist i Tabell 6.4.1.

Tabell 6.4.1 Toksisitetstest på solidagenon

Forbindelse	% dødelighet		
	1000 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
Solidagenon	63	10	6
DMSO (negativ kontroll) gav 0 % dødelighet			

Resultatet av testen viste at solidagenon ikke var spesielt toksisk for rekelarver i lave doser. Som for rækstraktene vil det også her være unødvendig å beregne LC_{50} -verdi, siden

forbindelsen var lite toksisk og tallene i tabellen var unøyaktige. Resultatene ble framstilt grafisk i Figur 6.4.4.



Figur 6.4.4 Grad av dødelighet

Søk i ulike databaser viste at solidagenon ikke hadde blitt testet for radikalscavenging, 15-LO inhibering og toksisitet tidligere.

6.4.2 Fraksjonering av RO7

VersaFlash kolonne-separasjon

RO7 ble kromatografert på en normalfase silikakolonne. Det ble samlet opp 32 kolonnefraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene RO7.1-RO7.8 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av ceric-spraying. Det ble applisert 188 mg på kolonnen, og det samlede utbyttet var 132,3 mg (70 %) (Tabell 1.2.27 i vedleggsdelen). Tap av stoff kunne skyldes de samme grunnene som beskrevet i avsnitt 6.3.1 Fraksjonering av blad etylacetat ekstrakt.

NMR-spektroskopi

NMR-spektrene viste at RO7.4 og RO7.5 var mest interessant, men de var ikke helt rene. Spektrene tydet på at fraksjonene hadde en solidagenon-liknende struktur. Disse to fraksjonene ble derfor valgt ut til videre opprensing.

6.4.3 Videre separasjon av RO7.4

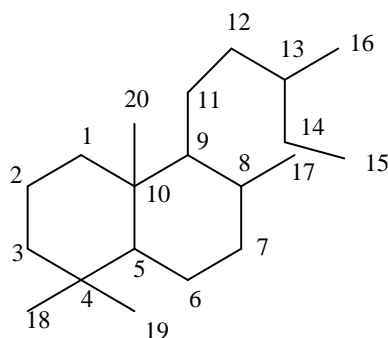
Preparativ HPLC

Preparativ HPLC-fraksjonering av fraksjon RO7.4 (28,7 mg) på en omvendt fase kolonne gav

11 fraksjoner og et utbytte på 30,8 mg (107 %). Dette gav fraksjonene RO7.4.1-RO7.4.10. At utbytte var større enn 100 % skyldtes nok usikkerhet og unøyaktighet i vekta og at fraksjonene ikke var fullstendig tørre. I tillegg kunne dette også skyldes at fraksjoneringen hadde tatt med seg en del forurensninger som var igjen i kolonnen etter tidligere bruk.

NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spektre viste at fraksjonene RO7.4.2B og RO7.4.4 så ut til å inneholde samme komponent. De hadde signaler som indikerte at denne komponenten hadde liknende labdan skjelett som solidagenon.



Figur 6.4.5 *Labdan diterpen skjelett* (Chinou, 2005)

Labdan diterpen skjelett har følgende karakteristiske trekk i ^1H -NMR spektrum (Anthonsen, 1968):

- Multipler og singletter i alifatisk området som stammer fra protoner til fire metylgrupper. Det er tre tertiære metylgrupper ved ca 0.98, 1.13 og 1.15 ppm og en olefinsk ved ca 1.90-2,0 ppm. Dersom skjelettet har en dobbeltbinding i C-7, vil den fjerde metylgruppen som er bundet til dette karbonet være olefinsk og gi signaler ved ca 1.90-2,0 ppm. Hvis dette er tilfellet, så vil protonet på C-7 gi en singlett ved området 4,9-5,9 ppm.
- Protonet på C₅ vises som singlett ved 2.2-2.7 ppm eller noe lavere dersom protonet er ortho til keto-gruppen på C-6.

Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble utført for å sjekke om fraksjonene RO7.4.2B, RO7.4.4 og RO7.4.5 var identiske. HPLC-kromatogrammer viste at hver fraksjon bestod av en hovedforbindelse som var dominerende. Hovedforbindelsen i disse fraksjonene hadde ganske like retensjonstider og dermed inneholdt de samme komponentene. Litt små forskjeller i retensjonstid skyldtes ulik

injeksjonstid (Tabell 6.4.2).

Tabell 6.4.2 Oversikt over retensjonstider for fraksjoner fra RO7.4 ved 230 nm

Fraksjon	Retensjonstid (minutt)
RO7.4.2B	25,4
RO7.4.4	25,8
RO7.4.5	25,6

Sammenslåing av fraksjoner

Basert på NMR-spektre og resultater av analytisk HPLC ble det bekreftet at fraksjonene RO7.4.2, RO7.4.4 og RO7.4.5 var identiske, og de ble dermed slått sammen. Dette gav fraksjon RO7.4S med en vekt på 7,8 mg.

6.4.4 Videre separasjon av RO7.5

Preparativ HPLC

Den første fraksjoneringen av fraksjon RO7.5 som ble fraksjonert på en omvendt fase preparativ HPLC kolonne, gav 18 fraksjoner. Det samlede utbyttet ble 60,1 mg (362 %). Dette gav fraksjonene RO7.5.1-RO7.5.18. Den andre HPLC-fraksjoneringen av fraksjon RO7.5 gav 13 fraksjoner. Det samlede utbyttet ble 21,7 mg (131 %). Dette gav fraksjonene RO7.5.R1-RO7.5.R13. At utbytte var større enn 100 % skyldtes de samme grunnene som beskrevet i avsnitt 6.4.3 Videre separasjon av RO7.4.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spektre viste at fraksjonene RO7.5.5, RO7.5.7, RO7.5.9, RO7.5.11, RO7.5.12, RO7.5.13, RO7.5.15, RO7.5R6, RO7.5R8, RO7.5R10, RO7.5.R12 og RO7.5.R13 hadde en del interessante signaler. Mange av disse fraksjoner hadde meget like spektre og dette kunne tyde på at de inneholdt samme komponent eller med forholdsvis lik struktur.

Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble utført for å sjekke om hvilke av fraksjonene RO7.5.5, RO7.5.7, RO7.5.9, RO7.5.11, RO7.5.12, RO7.5.13, RO7.5R6, RO7.5R8, RO7.5R10, RO7.5.R12 kunne være like. HPLC-kromatogrammer viste at hver fraksjon inneholdt en hovedforbindelse som var dominerende. Noen av hovedforbindelsene i de ulike fraksjoner hadde ganske like retensjonstider og dermed inneholdt disse fraksjonene samme forbindelse (Tabell 6.4.3). Litt

små forskjeller i retensjonstid skyldtes ulik injeksjonstid.

Tabell 6.4.3 *Oversikt over retensjonstider for fraksjoner fra RO7.5 ved 230 nm*

Fraksjon	Retensjonstid (minutt)
RO7.5.5	20,2
RO7.5.R6	20,6
RO7.5.7	21,5
RO7.5.R8	21,5
RO7.5.9	24,0
RO7.5.R10	23,4
RO7.5.11	25,4
RO7.5.12	25,5
RO7.5.13	26,0
RO7.5.R12	25,8

Sammenslåing av fraksjoner

På bakgrunn av NMR-spektrene og HPLC-resultatene ble fraksjoner som så ut til å inneholde samme komponent slått sammen. Dette gav fraksjon RO7.5.S1-RO7.5.S4. Fraksjonene RO7.5.9 og RO7.5.R10 ble slått sammen med fraksjon RO7.4.S, fordi NMR-spektre og HPLC-resultater viste at disse fraksjonene inneholdt samme komponent som RO7.4.S, se Tabell 6.4.4. Vekten til RO7.5.9 og RO7.5.R10 var 3,0 mg, dermed økte vekten til RO7.4.S til 10,8 mg.

Tabell 6.4.4 *Sammenslåing av fraksjoner fra RO7.5*

Fraksjon	Sammenslåing av fraksjoner	Vekt (mg)
RO7.5.11 RO7.5.12 RO7.5.13 RO7.5.R12	RO7.5.S1	7,6
RO7.5.15 RO7.5.R13	RO7.5.S2	8,5
RO7.5.9 RO7.5.R10	RO7.4.S	3,0
RO7.5.7 RO7.5.R8	RO7.5.S3	3,9
RO7.5.5 RO7.5.R6	RO7.5.S4	6,8

6.4.5 Fraksjonering av RO10

VersaFlash kolonnekromatografi

Fraksjon RO10 ble kromatografert på en normalfase silikakolonne. Det ble samlet 41 kolonnefraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene RO10.1-RO10.3 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av ceric-spraying. Det samlede utbyttet var 160,0 mg (80 %). Tap av stoff kunne skyldes de samme grunnene som beskrevet i avsnitt 6.3.1 Fraksjonering av blad etylacetat ekstrakt. Det var fraksjonene RO10.1 og RO10.2 som hadde størst utbytte med henholdsvis 50 mg og 80 mg (Tabell 1.2.28 i vedleggsdelen).

NMR-spektroskopi

NMR-spektrene viste at fraksjonene RO10.1 og RO10.2 hadde signaler som kunne tyde på at de inneholdt et diterpen med labdan grunnstruktur. Av denne grunn ble de nevnte fraksjonene valgt ut til videre arbeid.

6.4.6 Videre separasjon av RO10.1

Sentrifugalt akselerert TLC (CA-TLC)

Fraksjon RO10.1 ble kromatografert ved CA-TLC og det ble samlet opp 9 fraksjoner. Disse slått sammen til fraksjonene RO10.1.1-RO10.1.3. Samlet utbytte var 57,2 mg (114 %) (Tabell 1.2.29 i vedleggsdelen). Det høye utbytte skyldtes nok usikkerhet og unøyaktighet i vekta og at fraksjonene ikke var fullstendig tørre. I tillegg kunne dette også skyldes at fraksjoneringen hadde tatt med seg en del silikagel fra stasjonærfasen.

NMR-spektroskopi

NMR-spektrene viste at fraksjon RO10.1.1 var mest interessant (NMR-spektrum 49-50). Den hadde et signalmønster som indikerte mulig innhold av terpenoider, men de var ikke beslektet med solidagenon. Den kunne også inneholde en del fett. Siden fraksjonen antakelig ikke inneholdt labdan type diterpen, ble den ikke fraksjonert videre.

6.4.7 Videre separasjon av RO10.2

Sentrifugalt akselerert TLC (CA-TLC)

Fraksjon RO10.2 ble kromatografert ved CA-TLC og det ble samlet opp 10 fraksjoner. Disse slått sammen til fraksjonene RO10.2.1-RO10.2.5. Samlet utbytte var 41,4 mg (55 %). Det store tapet kunne skyldes irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Det var fraksjon

RO10.2.2 som hadde størst utbytte med en vekt på 33,2 mg (Tabell 1.2.30 i vedleggsdelen).

NMR-spektroskopi

Det var kun fraksjon RO10.2.2 som var mest interessant. Spektra viste dobbelt sett av signaler og signalmønsteret var meget komplisert. Dette kunne tyde på at fraksjonen bestod av to nært beslektede stoffer (NMR-spektrum 51-52).

UV-spektroskopi

UV-spektrumet til fraksjon RO10.2.2 viste et absorpsjonsmaksimum ved 229 nm. Det var trolig de to nye forbindelsene i RO10.2.2 som absorberte UV-lys ved den nevnte bølgelengden. Dette kunne tyde på at forbindelsene hadde samme evne til å absorbere UV-lys.

UV-spektroskopi brukes i praksis til å påvise konjugerte dobbeltbindinger som gir absorpsjon over 200 nm. Dess flere dobbeltbindinger i konjugasjon dess høyere blir bølgelengden (Solomons *et al.*, 2004).

Ved analytisk HPLC er det viktig å vite hvor stoffene i en prøve absorberer UV-lys. Dette for å kunne detektere forbindelser som blir eluert ut av kolonnen ved en bestemt bølgelengde. Av denne grunn ble UV-spektroskopi utført.

6.4.8 Videre separasjon av RO10.2.2

Preparativ HPLC

Fraksjon RO10.2.2 ble først fraksjonert på en omvendt fase preparativ HPLC kolonne. Det ble samlet opp 5 fraksjoner, RO10.2.2.1-RO10.2.2.5. Deretter ble noen av de opparbeidede fraksjoner fraksjonert på nytt. Dette gav 15 fraksjoner, men ingen av disse var rene. Dette skyldtes at fraksjon RO10.2.2 inneholdt to nært beslektede stoffer med liten forskjell i retensjonstid. Deres retensjonstid var henholdsvis 20,7 min og 21,2 min. Det samlede utbyttet ble 37,6mg (113 %). At utbytte var større enn 100 % kunne skyldes de samme grunnene som beskrevet i avsnitt 6.4.3 Videre separasjon av RO7.4.

NMR-spektroskopi

NMR-spektrene til fraksjonene etter preparativ HPLC av fraksjon RO10.2.2 viste fortsatt dobbelt sett av signaler. Signalmønsteret til fraksjonene var meget komplisert og kunne tyde

på innhold av en del stoffer av labdane type diterpener. Ved flere opprensninger på HPLC-kolonnen ble et av stoffene mer dominerende, men stoffet ble ikke helt rent. Det ble besluttet ikke å arbeide videre med disse fraksjonene på grunn av tidsmangel og vanskelighet med å isolere rene stoffer (NMR-spektrum 53).

6.4.9 Fraksjonering av RO11

VersaFlash kolonneseparasjon

Fraksjon RO11 ble kromatografert på en omvendt fase C₁₈ kolonne. Det ble samlet opp 65 kolonnefraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene RO11.1-RO11.7 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av ceric-spraying. Det samlede utbyttet var 273,2 mg (81 %) (Tabell 1.2.32 i vedleggsdelen). Tap av stoff kunne skyldes de samme grunnene som beskrevet i avsnitt 6.3.1 Fraksjonering av blad etylacetat ekstrakt.

NMR-spektroskopi

NMR-spektrene til fraksjonene RO11.2 og RO11.3 var mest interessant (NMR-spektrum 54-56). De hadde et signalmønster som tydet på innhold av diterpener med et labdan skjelett.

UV-spektroskopi

UV-spektrum til RO11.2 og RO11.3 var ganske like og deres absorpsjonsmaksimum var funnet å være ved 260 nm. Grunnen til at UV-spektroskopi ble utført for disse fraksjonene var som beskrevet i avsnitt 6.4.7 Videre separasjon av RO10.2.

Analytisk HPLC

Fraksjonene RO11.2 og RO11.3 ble undersøkt ved analytisk HPLC. Fraksjon RO11.2 viste seg å være ganske ren med to tydelige hovedtopper i kromatogrammet. Den ene toppen hadde retensjonstid på 8,3 min, mens den andre var på 14,6 min. Disse toppene var trolig kloroform (8,3 min) og hovedstoffet i fraksjonen. HPLC-kromatogram til fraksjon RO11.3 gav fire hovedtopper med retensjonstider på henholdsvis 4,55 min, 8,33 min, 15,05 min og 21,37 min. Hovedtoppen med retensjonstiden 15,05 min kunne være det som ble kalt for hovedstoff i fraksjon RO11.2. Forskjell i retensjonstid skyldtes trolig ulik injeksjonstid. Fraksjonene RO11.2 og RO11.3 ble ikke valgt ut til videre opprensing. Dette på grunn av tidsmangel.

6.4.10 Isolerte forbindelser fra RO

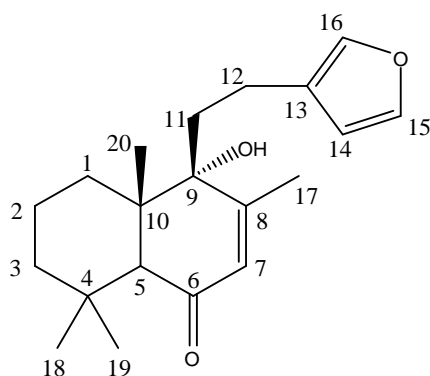
6.4.10.1 Identifisering av solidagenon

Solidagenon

Molekylvekt: 316 g/mol

Strukturformel: $C_{20}H_{28}O_3$

Solidagenon er et diterpen av labdan type, og har tidligere blitt isolert fra roten til *S. canadensis* av Anthonsen i 1968 (Anthonsen, 1968).



Figur 6.4.6 Molekylstruktur for solidagenon (Anthonsen, 1968)

NMR-spektroskopi

Fraksjon RO6 var en stor fraksjon og ga et meget godt spektrum med klare signaler (NMR-spektrum 41-42) og ble identifisert som solidagenon etter sammenligning med litteraturreferanseverdier av både 1H - og ^{13}C -NMR for solidagenon (Tabell 1.2.38).

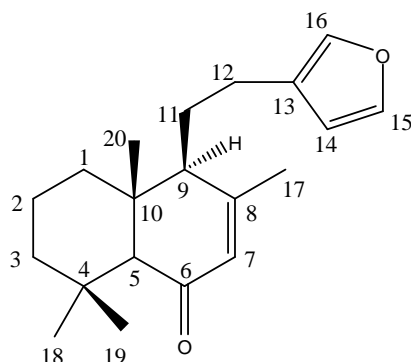
6.4.10.2 Identifisering av deoksysolidagenon

Deoksysolidagenon

Molekylvekt: 300 g/mol

Strukturformel: $C_{20}H_{28}O_2$

Deoksysolidagenon ble tidligere funnet i *S. migrosa* (Torres *et al.*, 1989). Søk i ulike databaser (SciFinder, PubMed, Google Scholar) viste at denne forbindelsen ikke har blitt isolert fra *S. canadensis* tidligere.



Figur 6.4.7 Molekylstruktur for deoksysolidagenon (Torres *et al.*, 1989)

NMR-spektroskopi

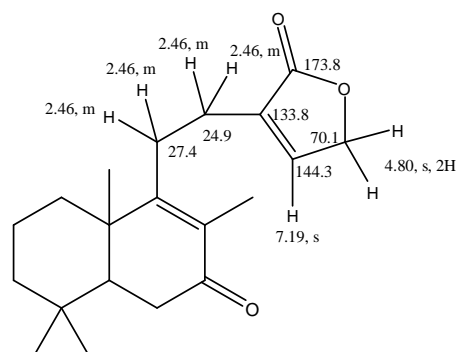
NMR-spektrene (NMR-spektrum 39-40) til RO2 inneholdt en del signaler som liknet på solidagenon, men fraksjonen var ikke helt ren. Siden denne fraksjonen kom veldig tidlig ut ved VersaFlash kolonne-separasjon, kunne ikke den være solidagenon. Den kunne muligens inneholde stoffer som var beslektet med solidagenon, for eksempel deoksysolidagenon. Det ble foretatt søk etter NMR verdier for den nevnte substansen i SciFinder. Søket gav et treff som hadde kun ^{13}C -NMR data. Fraksjon RO2 ble identifisert som deoksysolidagenon etter sammenligning av NMR data med litteraturen (Tabell 1.2.39).

Deoksysolidagenon og solidagenon er kun strukturelt forskjellig ved at deoksysolidagenon har et proton som er bundet til C-9, mens det er en OH-gruppe som er bundet til dette karbonet i solidagenon. C-9 har nabokarbonene C-8, C-10 og C-11, og disse karbonene har ingen elektronegative substituent. Dette betyr at protonet på C-9 er skjermet og befinner seg antakelig i det alifatiske området i ^1H -NMR-spektrumet. Ved sammenligning med forbindelsen ”nummer 13” i en artikkel publisert av Zdero *et al.* (Zdero *et al.*, 1991) ble det bekreftet at deoksysolidagenon har samme grunnstruktur som denne forbindelsen. Dermed kan det antas at H-9 i deoksysolidagenon vil ha samme skiftverdi som H-9 i den nevnte forbindelse. På bakgrunn av de nevnte forhold og ved sammenligning med ^1H -NMR data til solidagenon ble ^1H -NMR kjemiske skift-verdier bestemt for deoksysolidagenon (Tabell 1.2.40). Strukturen til forbindelse ”nummer 13” er vist i Figur 6.4.9 i avsnitt 6.4.10.3 Identifisering og strukturoppklaring av forbindelse i fraksjon RO7.4.S.

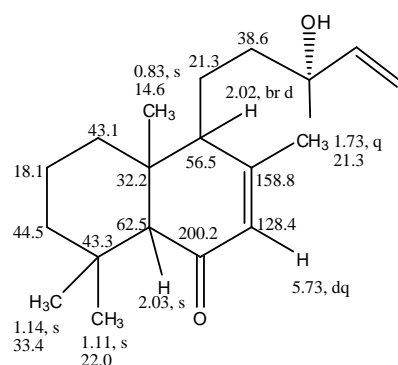
6.4.10.3 Identifisering og strukturoppklaring av forbindelse i fraksjon RO7.4.S

Strukturoppklaring

NMR-spektrene til fraksjon RO7.4.S (NMR-spektrum 57-58) viste signaler som indikerte at forbindelsen i denne fraksjonen måtte være et diterpen med et labdan skjelett. Det ble foretatt søk i SciFinder for å finne aktuelle forbindelser som kunne ha et labdan-liknende skjelett. Søket gav en del treff. Ved nærmere sammenligning med NMR-data som var funnet i litteraturen, ble det funnet struktur elementer som gav en god overensstemmelse med data i fraksjon RO7.4.S (Tabell 1.2.41 og 1.2.42). Det ene elementet (element 1) var en sidekjede (Figur 6.4.8), mens det andre elementet (element 2) var en grunnstruktur (Figur 6.4.9).

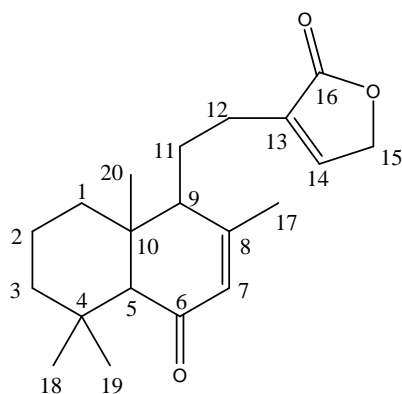


Figur 6.4.8 Struktur element 1 (sidekjede) (Giang *et al.*, 2005)



Figur 6.4.9 Struktur element 2 (grunnstruktur) (Zdero *et al.*, 1991)

Ved å sette sammen struktur elementene 1 og 2 ble det dannet et nytt diterpen som har samme grunnstruktur som deoksysolidagenon. Foreløpig struktur til det nye diterpenet ble som vist i Figur 6.4.10.



Figur 6.4.10 Molekylstrukturforslag til forbindelsen i fraksjon RO7.4.S

Den foreslåtte strukturen ble søkt etter i SciFinder, og resultatet viste at det var ingen forbindelser som hadde en slik struktur. Denne forbindelsen var derfor et helt nytt diterpen. Dette var altså første gang dette diterpenet ble identifisert og strukturoppklart.

UV-spektroskopi

UV-spektrum til RO7.4.S viste et absorpsjonsmaksimum ved 237 nm. Absorbansen ble målt til å være 0,148. Et absorpsjonsmaksimum ved 237 nm kunne tyde på at strukturen til den nye forbindelsen inneholdt konjugerte dobbeltbindinger som kunne absorbere UV-lys med bølgelengder over 200 nm (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2004), (Solomons *et al.*, 2004). Dette stemte godt med den foreslåtte strukturen til det nye terpenet i fraksjon RO7.4.S.

Massespektroskopi

Fraksjon RO7.4S ble analysert ved LC/MS for å bekrefte dens molekylmasse. På bakgrunn av NMR verdier skulle forbindelsen ha følgende strukturformel $C_{20}H_{28}O_3$ og tilsvarte en molekylvekt på 316,43. Massespektrumet ga en topp med m/z 317 ($M+1$) som tilsvarte en molekylvekt lik 316. Dette gav en god overensstemmelse med det som var funnet ved NMR-spektroskopi.

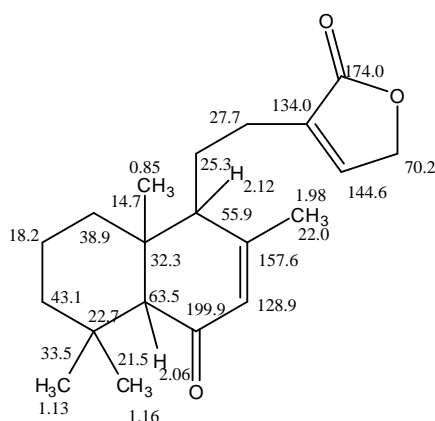
2-D NMR-spektroskopi

For å oppklare bindingsmønsteret, samt å bekrefte den foreslåtte strukturen ble det utført COSY, HSQC og HMBC spektroskopi på fraksjon RO7.4.S. COSY gir informasjon om hvordan de ulike protonene er koplet med hverandre i molekylet. For eksempel proton på C-1 ved 1.18 ppm viste en krysstopp med protonet på C-2 som hadde en ppm-verdi på 1.49 (Tabell 1.2.43). HSQC viser bindingsmønsteret mellom C og H som ligger en

bindingsavstand fra hverandre. HMBC viser også koblinger mellom C og H som ligger 2 og 3 bindingsavstander fra hverandre (NMR-spektrum 59-61).

På bakgrunn av resultater fra COSY, HSQC og HMBC (Tabell 1.2.43 i vedleggsdelen) ble den foreslåtte strukturen til forbindelsen i RO7.4.S bestemt. Forbindelsens stereokjemi ble ikke bestemt på grunn av tidsmangel.

Forbindelsen i fraksjon RO7.4S har fått det systematiske navnet 15,16-epoksy-labda-7,13-dien-6,16-dion. Som trivialnavnet til forbindelsen foreslås solidatanon.

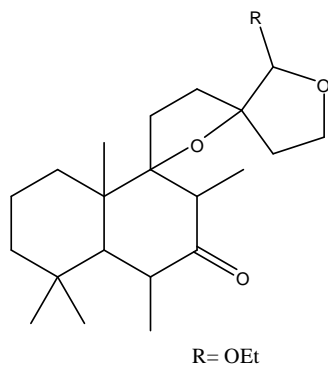


Figur 6.4.11 Endelig molekylstruktur for forbindelsen i fraksjon RO7.4.S med kjemiske skiftverdier i NMR-spektrene

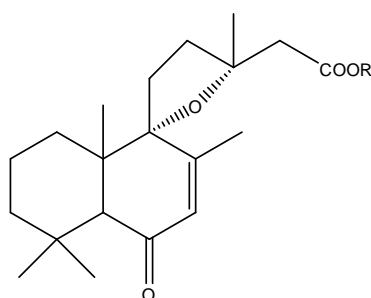
6.4.10.4 Identifisering og strukturoppklaring av forbindelse i fraksjon RO7.5.S2

NMR-spektroskopi

NMR-spektrene til fraksjon RO7.5.S2 hadde et signalmønster som tydet på innhold av diterpen med et labdan skjelett (NMR-spektrum 62-63). Ved sammenligning med NMR-data funnet i litteraturen, ble det funnet to strukturelementer som gav en god overensstemmelse med data til fraksjon RO7.5.S2 (Tabell 1.2.44 og 1.2.45). Det ene elementet (element 2.1) var en furanring som var bundet til en annen furanring (Figur 6.4.12). Det andre elementet (element 2.2) var en grunnstruktur som var karakteristisk for labdan diterpener, men det hadde i tillegg en furanring som sidekjede (Figur 6.4.13).

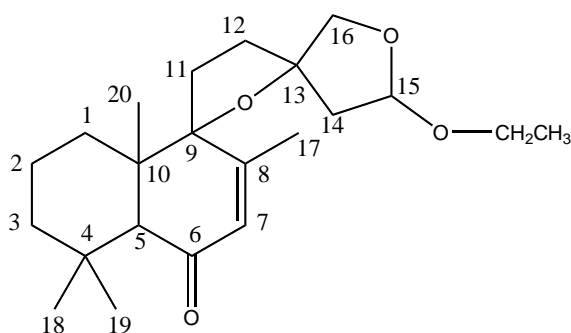


Figur 6.4.12 Furanring (element 2.1) (Rustaiyan *et al.*, 1992)



Figur 6.4.13 Grunnstruktur med furanring (element 2.2) (Hoffmann *et al.*, 1982)

Foreløpig struktur til det nye diterpenet ble som vist i Figur 6.4.14. Søk i SciFinder gav ingen treff for den foreslåtte strukturen. Dermed var det stor sannsynlighet for at den nye forbindelsen i fraksjon RO7.5.S2 ikke hadde blitt isolert og strukturoppklart tidligere.



Figur 6.4.14 Molekylstrukturforslag til forbindelsen i fraksjon RO7.5.S2

Massespektroskopi

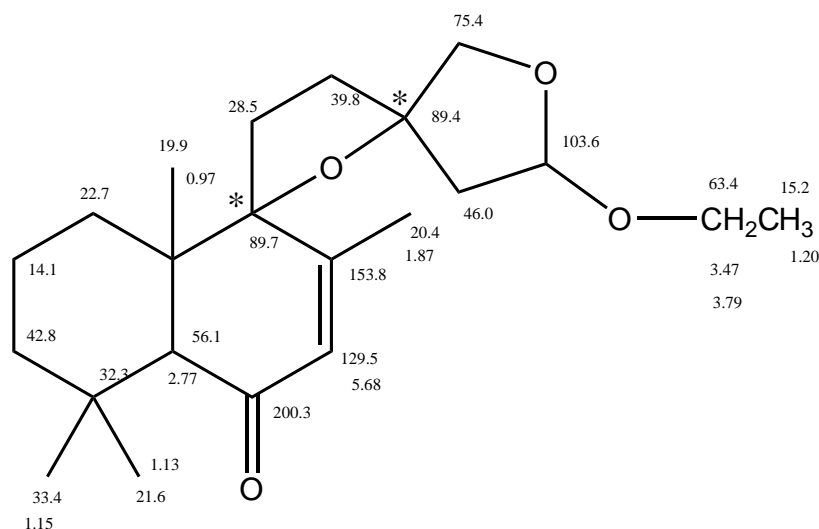
I følge strukturen som ble bestemt på bak grunn av NMR data, skulle forbindelsen i RO7.5.S2 ha strukturformelen $C_{22}H_{34}O_4$ som medførte en molekylvekt på 362.49. MS av fraksjon

RO7.5.S2 viste et observert molekylion lik 363 (M+1), som tilsvarte en masse på 362. Dermed kunne dette bekrefte at den foreslåtte strukturen var riktig.

2-D NMR-spektroskopi

For å oppklare bindingsmønsteret, samt å bekrefte den foreslåtte strukturen ble det utført COSY, HSQC og HMBC spektroskopi (NMR-spektrum 64-66) på fraksjon RO7.5.S2. På bakgrunn av resultatene fra de nevnte metodene ble den foreslåtte strukturen til forbindelsen i RO7.5.S2 bekreftet. Det var antakelig flere isomerer av den nye forbindelsen i fraksjon RO7.5.S2, men kun to ble oppklart. Dette gav isomer 1 og 2 (Tabell 1.2.46-1.2.47 i vedleggsdelen).

Forbindelsen i fraksjon RO7.5.S2 har trolig to stereosentre henholdsvis ved C-9 og C-13, men dens stereokjemi ble bestemt på grunn av tidsmangel. Den har det systematiske navnet 15-etoksy-9,13,15,16-bisepoksy-labdan-7-ene-6-on. Som trivialnavn foreslås solidahelon.



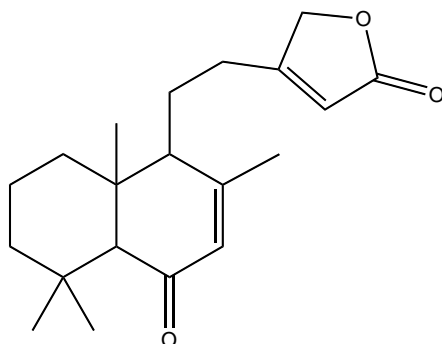
Figur 6.4.15 Molekylstruktur til forbindelsen i fraksjon RO7.5.S2 med kjemiske skiftverdier, * indikerer stereogent senter

6.4.10.5 Identifisering og strukturoppklaring av forbindelse i fraksjon RO7.5.S3

NMR-spektroskopi

Fraksjon RO7.5.S3 ble identifisert som ent-16-hydroksy-6-oxo-labdan-7,13-dien-15-syre lakton etter sammenligning med tidligere publisert ^1H -NMR-data for forbindelsen (Tabell

1.2.48), (Bohlmann *et al.*, 1983), (NMR-spektrum 67-68). Søk i SciFinder etter forbindelsen viste at den var rapportert en gang tidligere fra planten *Acritopappus confertus* (Bohlmann *et al.*, 1983). Dette var derfor første gang den nevnte forbindelsen ble isolert fra *S. canadensis*.



Figur 6.4.16 *ent-16-hydroksey-6-oxo-labdan-7,13-dien-15-syre lakton* (Bohlmann *et al.*, 1983)

De fleste NMR verdier stemte godt med referansen, men for protonene 11 og 11' var det imidlertid ingen god overensstemmelse. I tillegg var ^1H -NMR data for H-1, H-2 og H-3 ikke rapportert tidligere. Derfor ble det utført COSY, HSQC og HMBC for å oppklare de nevnte protonene (NMR-spektrum 69-71). ^{13}C -NMR data for forbindelsen i fraksjon RO7.5.S3 var heller ikke rapportert tidligere. Basert på resultater fra de nevnte metodene ble ^{13}C -NMR data og skiftverdier for H-1, H-2 og H-3 for forbindelsen bestemt. Skiftverdier til protonene 11 og 11' ble litt endret i forhold til litteraturen (se Tabell 1.2.49 i vedleggsdelen). Den oppgitte ^{13}C -NMR data er i overensstemmelse med to referanser som hadde lignende struktur som forbindelsen i fraksjon RO7.5.S3 (Tabell 1.2.50) (Vardamides *et al.*, 2007) og (Zdero *et al.*, 1991).

Massespektroskopi

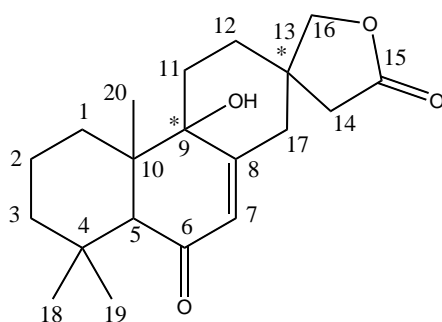
MS av fraksjon RO7.5.S3 viste en topp med m/z 317 ($M+1$) som tilsvarte en molekylvekt på 316. Dette stemte overens med forbindelsen i fraksjon RO7.5.S3 som har en molekylvekt lik 316,42.

6.4.10.6 Identifisering og strukturoppklaring av forbindelser i fraksjon RO7.5.S4

NMR-spektroskopi

NMR-spektrene til fraksjon RO7.5.S4 viste et dobbelte sett med signaler (NMR-spektrum 72-

73). Dette tydet på at det var to forbindelser i fraksjonen. Fraksjonen hadde et mønster som indikerte innhold av forbindelser med labdan diterpen skjelett, sannsynligvis to stereoisomere former. I tillegg hadde den et signal i ^{13}C -NMR spektrum ved 174 ppm som indikerte innhold av ester eller karboksylsyre. NMR-spektrene tydet på at fraksjonen inneholdt et stoff med spirolaktonstruktur. Søk i SciFinder gav treff på en forbindelse som inneholdt et spiroelement (Dorta *et al.*, 2002). På bakgrunn av data funnet i NMR-spektrene og ved sammenligning med litteraturen, ble det satt opp et forslag til struktur for forbindelsen i fraksjon RO7.5.S4, se Figur 6.4.17.



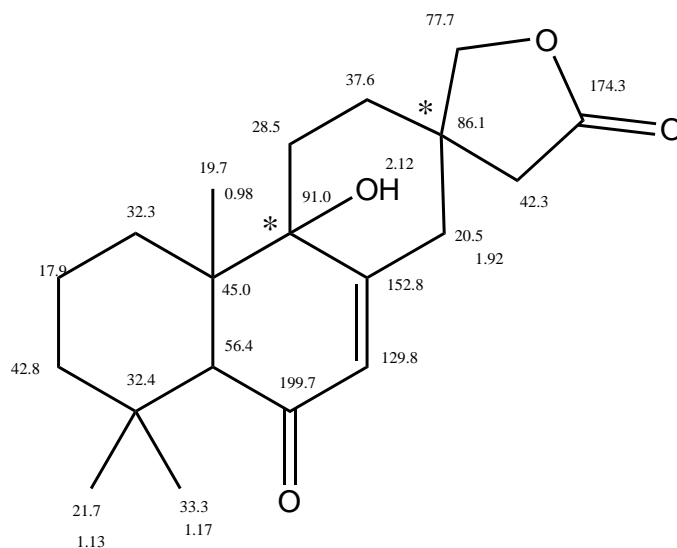
Figur 6.4.17 Molekylstrukturforslag til forbindelsen i fraksjon RO7.5.S4 * = stereosenter

Massespektroskopi

Ut fra molekylstrukturforslaget skulle forbindelsen i RO7.5.S4 ha strukturformelen $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ som tilsvarte en molekylvekt på 332.42. MS av fraksjon RO7.5.S4 viste et observert molekylion lik 333 ($\text{M}+1$), som tilsvarte en masse på 332. Dermed kunne dette støtte opp om den foreslåtte strukturen var rimelig.

2-D NMR-spektroskopi

Bindingsmønsteret til den foreslåtte strukturen ble oppklart ved COSY, HSQC og HMBC spektroskopi (NMR-spektrum 74-76). På bakgrunn av tolkningen av spektrene fra de nevnte metodene ble den foreslåtte strukturen til forbindelsen i RO7.5.S4 bekreftet. Det var antakelig flere isomerer av denne forbindelsen i fraksjon RO7.5.S4, men kun to ble oppklart (Tabell 1.2.51-1.2.52 i vedleggsdelen). Dette gav isomer 1 og 2. Stereokjemien til forbindelsen i fraksjon RO7.5.S4 ble ikke bestemt på grunn av tidsmangel. Den nye forbindelsen har det systematiske navnet 9-hydroksy-15,16-epoksy-16-syklo-9-friedolabda-7-ene-6,15-dion. Som trivialnavn foreslås solidakalon.



Figur 6.4.18 Molekylstruktur til forbindelsen i fraksjon RO7.5.S4 med kjemiske skiftverdier, * indikerer stereosenter

6.4.10.7 Identifisering og strukturoppklaring av fraksjon RO7.5.S1

NMR-spektroskopi

NMR-spektrene til fraksjon RO7.5.S1 (NMR-spektrum 77-78) viste et signalmønster som indikerte innhold av forbindelser med labdan skjelett.

Massespektroskopi

Massespektrum til fraksjon RO7.5.S1 på et MS-apparat viste en stor topp med m/z lik 333 ($M+1$), som tilsvarte en masse på 332. Denne toppen kunne muligens være molekylvekten til forbindelsen i fraksjon RO7.5.S1. Fraksjonen ble ikke identifisert og strukturoppklart på grunn av tidsmangel.

7 Konklusjon

S. canadensis ser ut til å inneholde flere stoffer med radikalfangende og 15-LO hemmende egenskaper. Toksisitetstesting av råekstraktene fra forskjellige deler av planten indikerte at den trolig ikke er toksisk i lave doser.

Fra blad etylacetat ekstrakt til *S. canadensis* ble det isolert fem renstoffer: 3,5-dicaffeoylkinasyre, 6"-O-acetyl-isoquercitrin (quercetin-3-(6-O-acetyl)-glukosid), isorhamnetin, kaempferol og quercetin. Det ser ut til at quercetin og isorhamnetin er hovedansvarlige for den potente radikalfangende og 15-LO hemmende aktiviteten i bladene. I tillegg viser det seg at bladene er en god kilde til 6"-O-acetyl-isoquercitrin.

Det ble isolert seks forbindelser av labdan-type diterpener fra det organiske ekstraktet til roten av planten. Tre av dem, solidagenon, deoksysolidagenon og ent-16-hydroksey-6-oxo-labdan-7,13-dien-15-syre lakton, var tidligere kjente forbindelser. Tre andre ble identifisert som 15,16-epoksey-labda-7,13-dien-6,16-dion, 15-etoksey-9,13,15,16-bisepoksey-labdan-7-ene-6-on og 9-hydroksey-15,16-epoksey-16-syklo-9-friedolabda-7-ene-6,15-dion. De tre sist nevnte har ikke blitt identifisert og strukturoppklart tidligere og er derfor nye naturstoffer.

Av alle de isolerte forbindelsene fra roten til *S. canadensis* er det kun solidagenon som er tidligere isolert fra denne planten, og det viser seg at den har 15-LO hemmende egenskaper. I tillegg utgjør den en stor andel av roten, ca 1 %, og den er derfor en hovedbestanddel i denne plantedelen.

S. canadensis inneholder en rekke bioaktive forbindelser, som kan bidra til plantens helende egenskaper. Dette kan antakelig forklare den omfattende tradisjonelle medisinske bruken av planten.

7.1 Forslag for videre arbeid

Det er mange interessante ekstrakter og fraksjoner som det absolutt bør arbeides videre med. Dette gjelder butanol ekstrakt fra blad, etylacetat og butanol ekstraktene fra blomst og stengel. De nevnte ekstraktene hadde høye aktiviteter både med hensyn på radikalscavenging og hemming av 15-LO. I tillegg viste diklormetan ekstraktene til de nevnte plantedelene å være aktive som 15-LO hemmer. Det ville derfor være interessant å undersøke disse nærmere.

Det ble ikke utført noen bioaktivitetstester på de nye isolerte stoffene fra rot organisk ekstrakt, unntatt solidagenon, som det ble utført DPPH-, 15-LO hemming og toksisitetstest på. Det vil derfor være aktuelt å utføre slike tester på de nye stoffene også. Fraksjon RO7.5.S1 ble ikke identifisert og strukturoppklart på grunn av knapphet med tid. Det vil derfor være aktuelt å fortsette dette arbeidet, grunnet NMR-spektrene til denne fraksjonen viste et svært interessant signalmønster. Fraksjonene RO10.2.2 og RO11.2 og RO11.3 hadde meget spennende signalmønstre som tydet på innhold av labdan type diterpener, men disse ble ikke arbeidet videre med i denne oppgaven på grunn av tidsmangel. Forskning har vist at diterpener av den nevnte typen har mange interessante biologiske aktiviteter og de kan betraktes som potensielle farmakologiske substanser (Chinou, 2005). Av denne grunn er det viktig å fortsette å isolere og identifisere fra de nevnte fraksjonene og andre fraksjoner fra roten som kunne inneholde labdan-type diterpener.

Det er også en rekke mellomfraksjoner til blad etylacetat ekstrakt (BE) og rot organisk som er aktuelle for videre arbeid. Fraksjonene BE2-BE5, BE1.0, BE1.3-BE1.8 var aktive som radikalfangere og er dermed av interesse.

Mange innholdsstoffer i den overjordiske delen av planten er tidligere blitt isolert og strukturoppklart. Dersom man fortsetter å undersøke denne delen av planten, ville sjansen for å oppdage nye stoffer trolig være nokså liten. Derimot er det rapportert relativt få stoffer fra roten. Her er det derfor store sjanser for å oppdage nye stoffer.

8 Referanseliste

- Agder Naturmuseum og botanisk hage. (2007). "Kanadagullris." 12.02.2008, <http://museumsnett.no/naturmuseum/fyr/vest/planter/kanadagullriss.html>.
- Agrawal P.K. 1989. *Carbon-13 NMR of flavonoids* Elsevier: Amsterdam.
- Altug I. 2003. *Isolation of cDNAs encoding (+)- and (-)-Germacrene D-Synthase, α -Gurjunene- and Cascarilladiene Synthase from *Solidago canadensis* L. and their functional Expression in *E. coli**. Universitetet i Hamburg: Doktorgradsavhandling. Hamburg.
- Andersen Ø.M. og Markham K.R. 2006. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press Taylor & Francis group: Boca Raton.
- Ansari K.U. 1996. Free radical induced diseases. *Journal of the Indian Medical Association* **94**: 238-9.
- Anthonsen T., McCabe P.H., McCrindle R. og Murray R.D.H. 1967. The Constitution and Stereochemistry of Solidagenone. *Acta Chemica Scandinavica* **21**: 2289.
- Anthonsen T. 1968. *Phytokjemiske studier innen slektene *Solidago* (Vaill.) og *Eupatorium* (Tourn.) L.* Norges tekniske høgskole: Doktorgradsavhandling. Trondheim.
- Anthonsen T., McCabe P.H., McCrindle R. og Murray R.D.H. 1969. Constituents of *Solidago* species - I. The constitution and stereochemistry of diterpenoids from *Solidago canadensis* L. *Tetrahedron* **25**: 2233-2239.
- Anthonsen T., McCabe P.H., McCrindle R., Murray R.D.H. og Young G.A.R. 1970. Constituents of *Solidago* species. II. Reactions of solidagenone, the major diterpenoid from *Solidago canadensis*. *Tetrahedron* **26**: 3091-7.
- Apáti P., Houghton P.J. og Kéry A. 2004. HPLC investigation of antioxidant components in *Solidago* herba. *Acta Pharmaceutica Hungarica* **74**: 223-31.
- Apati P., Houghton P.J., Kite G., Steventon G.B. og Kery A. 2006. In-vitro effect of flavonoids from *Solidago canadensis* extract on glutathione S-transferase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **58**: 251-256.
- Apáti P., Szentmihályi K., Kristó S.T., Papp I., Vinkler P., Szoke É. og Kéry Á. 2003. Herbal remedies of *Solidago*--correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **32**: 1045-53.
- Apati P., Kristo T.S., Szoke E., Kery A., Szentmihalyi K. og Vinkler P. 2003. Comprehensive evaluation of different solidaginis herba extracts. *Acta Horticulturae* **597**: 69-73.

- Artsdatabanken. (2007). "Norsk Svarteliste." 12.02.2008, <http://www.artsdatabanken.no/Article.aspx?m=171&amid=2585>.
- Aulton M.E. 2002. *Pharmaceutics : the science of dosage form design*. Churchill Livingstone: Edinburgh.
- Benevides P.J.C., Young M.C.M. og Bolzani V.S. 2004. Biological activities of constituents from *Psychotria spectabilis*. *Pharmaceutical Biology* **42**: 565-569.
- Bjålie J.G., Haug E., Sand O. og Sjaastad Ø.V. 1998. *Menneskekroppen: fysiologi og anatomi*. Universitetsforlaget: Oslo.
- Blois M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**: 1199-200.
- Blomhoff R. 2007. Antioksidanter og oksidativt stress. I *Mat og medisin : nordisk lærebok i generell og klinisk ernæring* Drevon C.A., Blomhoff R. og Bjørneboe G.-E.A. (red). Høyskoleforlaget: Kristiansand.
- Blumenthal M. og Busse W.R. 1998. *The Complete German commission E monographs : therapeutic guide to herbal medicines*. American Botanical Council in cooperation with Integrative Medicine Communications: Austin, Tex.
- Bode V. og Franz G. 1989. Heparinoide- ihre antikoagulierende wirkung. *Deutsche Apotheker-Zeitung* **129**: 672-675.
- Bohlmann F., Fritz U., King R.M. og Robinson H. 1980. Naturally occurring terpene derivatives. Part 277. Sesquiterpene and diterpene derivatives from *Solidago* species. *Phytochemistry* **19**: 2655-61.
- Bohlmann F., Zdero C., Jakupovic J., King R.M. og Robinson H. 1983. Diterpenes from *Acritopappus confertus*. *Phytochemistry* **22**: 2243-2252.
- Bradette-Hebert M.-E., Legault J., Lavoie S. og Pichette A. 2008. A new labdane diterpene from the flowers of *Solidago canadensis*. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **56**: 82-4.
- Breitmaier E. 2002. *Structure elucidation by NMR in organic chemistry : a practical guide* Wiley: 3. revidert utgave. Chichester.
- Budzianowski J., Skrzypczak L. og Wesolowska M. 1990. Flavonoids and Leiocarposide in Four *Solidago* Taxa. *Scientia Pharmaceutica* **58**: 15-23.
- Burrell R.C. og Houston F.G. 1948. Isolation of a saponin from the leaves of *Solidago canadensis*. *Journal of the American Chemical Society* **70**: 862.

- Carollo C.A., Hellmann-Carollo A.R., Siqueira J.M. og Albuquerque S. 2006. Alkaloids and a flavonoid from aerial parts (leaves and twigs) of *Duguetia furfuracea*- Annonaceae. *Journal of the Chilean Chemical Society* **51**: 837-841.
- Chanotiya C.S. og Yadav A. 2008. Natural Variability in Enantiomeric Composition of Bioactive Chiral Terpenoids in the Essential Oil of *Solidago canadensis* L. from Uttarakhand, India. *Natural Product Communications* **3**: 263-266.
- Chaturvedula V.S.P., Zhou B.-N., Gao Z., Thomas S.J., Hecht S.M. og Kingston D.G.I. 2004. New lupane triterpenoids from *Solidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase beta. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**: 6271-6275.
- Chebil L., Anthoni J., Humeau C., Gerardin C., Engasser J.-M. og Ghoul M. 2007. Enzymatic Acylation of Flavonoids: Effect of the Nature of the Substrate, Origin of Lipase, and Operating Conditions on Conversion Yield and Regioselectivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 9496-9502.
- Chinou I. 2005. Labdanes of Natural Origin - Biological Activities (1981-2004). *Current Medical Chemistry* **12**: 1295-1317.
- Chodera A., Dabrowska K., Sloderbach A., Skrzypczak L. og Budzianowski J. 1991. Effect of flavonoid fractions of *Solidago virgaurea* L on diuresis and levels of electrolytes. *Acta Poloniae Pharmaceuticae* **48**: 35-7.
- Cordell G.A. og Colvard M.D. 2005. Some thoughts on the future of ethopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* **100**: 5-14.
- Cragg G.M. og Newman D.J. 2002. Drugs from nature: past achievements, future prospects. I *Ethnomedicine and drug discovery*, Iwu M.M. og Wootton J.C. (red). Elsevier: Amsterdam.
- Cui S.W. 2005. *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications*. Taylor & Francis: Boca Raton.
- Devasagayam T.P.A., Tilak J.C., Bloor K.K., Sane Ketaki S., Ghaskadbi Saroj S. og Lele R.D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India* **52**: 794-804.
- Dobjanschi L., Vostinaru O. og Tă mas M. 2005. Criteria for *Solidago* species differentiation. *Acta Universitatis Cibiniensis, Serie F: Chemie* **8**: 41-45.
- Dorta E., Cueto M., Diaz-Marrero A.R. og Darias J. 2002. Stypolactone, an interesting diterpenoid from the brown alga *Stypopodium zonale*. *Tetrahedron Letters* **43**: 9043-9046.

- Facciola S. 1990. *Cornucopia - A Source Book of Edible Plants*. Kampong Publications: Vista, CA.
- Fernandez A.Z., Jain M.K. og Apitz-Castro R. (2001). "Eicosanoid Biosynthesis." 27.03.2008, www.els.net.
- Florence A.T. og Attwood D. 2004. *Physicochemical principles of pharmacy*. Pharmaceutical Press: London.
- Foster S. og Duke J.A. 1990. *A Field Guide to Medical Plants: eastern and central North America*. Houghton Mifflin Company: New York.
- Franz G. 1987. Structure-activity relation of polysaccharides with antitumor activity. *Farmaceutisch Tijdschrift voor België* **64**: 301-311.
- Fridovich I. (2001). "Oxidative stress." 27.03.2008, www.els.net.
- Funk C.D. og Tillmann C. 2001. 12/15-Lipoxygenase, Oxidative Modification of LDL and Atherogenesis. *Trends in Cardiovascular Medicine* **11**: 116–124.
- Giang P.N., Son P.T., Matsunami K. og Otsuka H. 2005. New labdane-type diterpenoids from *Leonurus heterophyllus* Sw. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **53**: 938-941.
- Glavind J. 1963. Antioxidants in animal tissue. *Acta Chemica Scandinavica* **17**: 1635-40.
- Gottlieb H.E., Kotlyar V. og Nudelman A. 1997. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *Journal of Organic Chemistry* **62**: 7512-7515.
- Grae I. 1974. *Nature's Colors: Dyes from Plants*. Macmillan Publishing Co., Inc.: New York.
- Greibrokk T., Lundanes E. og Rasmussen K.E. 2005. *Kromatografi: separasjon og deteksjon*. Pensumtjeneste: Oslo.
- Halliwell B. 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews* **52**: 253-65.
- Halliwell B. 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition reviews* **55**: S44-9; discussion S49-52.
- Halliwell B. (2005). "Free radicals and other reactive species in disease." 27.03.2008, www.els.net.
- Halliwell B. og Gutteridge J.M. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 4. utgave. Oxford University Press Inc.: New York.
- Hedding B. 2007. *Erythrina senegalensis - En medisinske plante fra Mali. Del A: Identifisering av bioaktive komponenter i rotbark. Del B: Etnofarmakologiske studier*. Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.: Hovedfagsoppgave. Oslo.

- Heinrich M., Barnes J., Gibbons S. og M. W.E. 2004. *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*. Churchill Livingstone: Edinburgh.
- Hiller K., Bader G., Reznicek G., Jurenitsch J. og Kubelka W. 1991. The main saponins of medicinally used species of the genus *Solidago*. *Pharmazie* **46**: 405-8.
- Hoffmann J.J. og McLaughlin S.P. 1982. Constituents of *Chrysanthamnus paniculatus* (Compositae): Chrysothame, a new diterpene, and 6-Oxogrindelic acid. *Journal of Organic Chemistry* **47**: 1725-1727.
- Hostettmann K., Hostettmann M. og Marston A. 1998. *Preparative chromatography techniques : applications in natural product isolation*. Springer: 2. utgave. Berlin.
- Houston F.G. og Burrell R.C. 1948. Isolation of inulin and an unidentified compound from the roots of *Solidago canadensis*. *Archives of Biochemistry* **16**: 299-300.
- Huang H., Guo S. og Chen G. 2007. Reproductive biology in an invasive plant *Solidago canadensis*. *Frontiers of Biology in China* **2**: 196-204.
- Hungria M., Joseph C.M. og Phillips D.A. 1991. Anthocyanidins and flavonols, major nod gene inducers from seeds of a Black-Seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology* **97**: 751-758.
- Hänsel R., Keller K., Rimpler H. og Schneider G. 1994. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis -Bind 6: Drogen P-Z*. Springer-Verlag: Berlin.
- Iwai K., Kishimoto N., Kakino Y., Mochida K. og Fujita T. 2004. In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 4893-8.
- Jiang T., Huang B.-K. og Qin L.-P. 2006. A survey of chemical and pharmacological studies on *Solidago*. *Journal of Chinese Integrative Medicine* **4**: 430-435.
- Kalemba D. 1992. Phenolic acids in four *Solidago* species. *Pharmazie* **47**: 471-472.
- Kasali A.A., Ekundayo O., Paul C. og Konig W.A. 2002. Epi-Cubebanes from *Solidago canadensis*. *Phytochemistry* **59**: 805-810.
- Kerr M.E., Bender C.M. og Monti E.J. 1996. An introduction to oxygen free radicals. *Heart & lung* **25**: 200-9; quiz 210-1.
- Kim M.-Y., Kim Y.-C. og Chung S.-K. 2005. Identification and in vitro biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot: inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**: 633-640.

- Kim S.-S., Park R.-Y., Jeon H.-J., Kwon Y.-S. og Chun W. 2005. Neuroprotective effects of 3,5-dicaffeoylquinic acid on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Phytotherapy Research* **19**: 243-5.
- Knight J.A. 1995. Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Annals of Clinical and Laboratory Science* **25**: 111-21.
- Krepinsky J. og Herout V. 1962. Plant substances. XVIII. Isolation of terpenic compounds from *Solidago canadensis*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **27**: 2459-62.
- Lam J., Christensen L.P., Farch T. og Thomasen T. 1992. Acetylenes from the roots of *Solidago* species. *Phytochemistry* **31**: 4159-61.
- Lewis W.H. og Elvin-Lewis M.P.F. 2003. *Medical botany : plants affecting human health* John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey.
- Li T.S.C. 2002. *Chinese and related North American herbs : phytopharmacology and therapeutic values* CRC Press LLC: Boca Raton.
- Lu T., Menelaou M.A., Vargas D., Fronczek F.R. og Fischer N.H. 1993. Polyacetylenes and diterpenes from *Solidago canadensis*. *Phytochemistry* **32**: 1483-8.
- Lyckander I.M. og Malterud K.E. 1996. Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* prevent oxidative inactivation of 15-lipoxygenase. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **54**: 239-246.
- Malterud K.E. 1998. Flavonoider og helse. *Tidsskrift for Norges Apotekerforening* **106**: 10-13.
- Malterud K.E. 2003. *Procedure for assay of 15-lipoxygenase inhibition*. Intern notat, Farmasøytisk Institutt, Seksjon for Farmakognosi, Universitetet i Oslo.
- Malterud K.E., Farbrot T.L., Huse A.E. og Sund R.B. 1993. Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. *Pharmacology* **47**: 77-85.
- Matsuura H., Amano M., Kawabata J. og Mizutani J. 2002. Isolation and measurement of quercetin glucosides in flower buds of Japanese Butterbur (*Petasites japonicus* subsp. *gigantea* Kitam.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **66**: 1571-1575.
- McDougall B., King P.J., Wu B.W., Hostomsky Z., Reinecke M.G. og Robinson W.E.J. 1998. Dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**: 140-6.
- McLaughlin J.L., Rogers L.L. og Anderson J.E. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal* **32**: 513-524.

- McMurry J. 2000. *Organic chemistry*. Brooks/Cole: 5. utgave. Pacific Grove, CA.
- Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E. og McLaughlin J.L. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **45**: 31-34.
- Moerman D.E. 1998. *Native American Ethnobotany*. Timber Press, Inc.: Portland, Oregon.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **26**: 211-219.
- Murach M., Hiller K., Franke P. og Hintsche R. 1975. Saponins of the genus *Solidago*. 2. Bayogenin, a sapogenin in *Solidago canadensis*. *Pharmazie* **30**: 619-20.
- Nest G.L., Caille O., Woudstra M., Roche S., Guerlesquin F. og Lexa D. 2004. Zn-polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: I optical and NMR studies. *Inorganica Chimica Acta* **357**: 775-784.
- Norsk kjemisk selskap. (2008). "Hva er krystallisasjon?" 25.03.2008, <http://www.kjemi.no/spor/svar.php?svar=140>.
- Ooi L.S.M., Wang H., He Z. og Ooi V.E.C. 2006 Antiviral activities of purified compounds from *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). *Journal of Ethnopharmacology* **106**: 187-91.
- Paganga G., Al-Hashim H., Khodr H., Scott B.C., Aruoma O.I., Hider R.C., Halliwell B. og Rice-Evans C.A. 1996. Mechanisms of antioxidant activities of quercetin and catechin. *Redox Report* **2**: 359-364.
- Papp I., Apati P., Andrasek V., Blazovics A., Balazs A., Kursinszki L., Kite G.C., Houghton P.J. og Kery A. 2004. LC-MS Analysis of Antioxidant Plant Phenoloids. *Chromatographia* **60**: S93-S100.
- Pauli G.F., Kuczkowiak U. og Nahrstedt A. 1999. Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids. *Magnetic Resonance in Chemistry* **37**: 827-836.
- Pedersen-Bjergaard S. og Rasmussen K.E. 2004. *Legemiddelanalyse*. Fagbokforlaget: Bergen.
- Pedersen B. 1998. *Generell kjemi for universiteter og høyskoler* Universitetsforlaget: Oslo
- Plants for a future. (2004). "*Solidago canadensis*-L." 06.12.2007, <http://www.pfaf.org/database/plants.php?Solidago+canadensis>.
- Rahaman M.S., Hasan A.M., Ali M.Y. og Ali M.U. 2006. A flavone from the leaves of *Cassia Alata*. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research* **41**: 93-96.

- Rahman K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging* **2**: 219-236.
- Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. og Moore P.K. 2003. *Pharmacology*. Churchill Livingstone: Edinburgh.
- Rastogi R.P., Mehrotra B.N., Sinha S., Pant P. og Seth R. 1993. *Compendium of Indian medicinal plants vol.1 1960-1969*. Central Drug Research Institute and Publications & Information Directorate, New Delhi: Lucknow.
- Rastogi R.P., Mehrotra B.N., Sinha S., Pant P. og Seth R. 1993. *Compendium of Indian medicinal plants vol.3 1980-1984*. . Central Drug Research Institute and Publications & Information Directorate, New Delhi.: Lucknow.
- Reznicek G., Jurenitsch J., Freiler M., Korhammer S., Haslinger E., Hiller K. og Kubelka W. 1992. Isolation and structure elucidation of new saponins from *Solidago canadensis*. *Planta Medica* **58**: 94-8.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. og Paganda G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* **2**: 152-159.
- Rodriguez J.A., Theoduloz C., Sánchez M., Razmilic I. og G. S.-H. 2005. Gastroprotective and ulcer-healing effect of new solidagenone derivatives in human cell cultures. *Life Sciences* **77**: 2193-2205.
- Rook o. (2002). "*Solidago canadensis*. Canada goldenrod
" 06.12.2007, <http://www.rook.org/earl/bwca/nature/herbs/solidagocan.html>.
- Rustaiyan A., Mosslemin-Kupaii M.H. og Zdero C. 1992. Furoabdanes and related compounds from *Ballota aucheri*. *Phytochemistry* **31**: 344-346.
- Røthe G. 2007. Viltveksande urter som krydder og helsekost. Tiltak i handlingsplan for økologisk landbruk i Troms. Bioforsk rapport **2**: 1-19.
- SABIMA. (2007). "Kanadagullris." 12.02.2008, <http://www.sabima.no/sider/tekst.asp?side=426>.
- Samuelsson G. 1999. *Drugs of natural origin : a textbook of pharmacognosy* Apotekarsocieteten: Stockholm.
- Schmeda-Hirschmann G., Astudillo L. og Palenzuela J.A. 2004. Biotransformation of solidagenone by *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* and *Curvularia lunata* cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **20**: 93-97.

- Schmeda-Hirschmann G., Rodriguez J. og Astudillo L. 2002. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. *Journal of Ethnopharmacology* **81**: 111-115.
- Schneider I. og Bucar F. 2005. Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase/cyclooxygenase. *Phytotherapy Research* **19**: 81-102.
- Schofield J.J. 1989. *Discovering Wild Plants: Alaska, Western Canada, The Northwest*. Alaska Northwest Books TM: Bothell, Washington.
- Sendobry S.M., Cornicelli J.A., Welch K., Bocan T., Tait B., Trivedi B.K., Colbry N., Dyer R.D., Feinmark S.J. og Daugherty A. 1997. Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties. *British Journal of Pharmacology* **120**: 1199-1206.
- Sigma-Aldrich. (2008). "VersaFlashTM High Throughput Flash Purification." 01.04.2008, http://sigma-aldrich.com/Brands/Supelco/Home/VersaFlash_splash_page.html.
- Slimestad R., Fossen T. og Vagen I.M. 2007. Onions: a source of unique dietary flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 10067-80.
- Smith H.H. 1933. *Bulletin of the Public Museum of the City of Milwaukee, Vol. 7: Ethnobotany of the Forest Potawatomi Indians*. Order of the Board of Trustees: Milwaukee, Wis.
- Solomons T.W.G. og Fryhle C.B. 2000. *Organic chemistry*. John Wiley & Sons: 7. utgave. New York.
- Solomons T.W.G. og Fryhle C.B. 2004. *Organic chemistry*. Wiley: 8. utgave. Hoboken, N.J.
- Tatefuji T., Izumi N., Ohta T., Arai S., Ikeda M. og Kurimoto M. 1996. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biological & pharmaceutical bulletin* **19**: 966-970.
- Tatsis E.C., Boeren S., Exarchou V., Trojanis A.N., Vervoort J. og Gerothanassis I.P. 2007. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry (Elsevier)* **68**: 383-393.
- Torres L.M.B., Roque N.F. og Akisue M.K. 1989. Diterpenes from the roots of *Solidago microglossa*. *Revista Latinoamericana de Quimica* **20**: 94-7.
- Universitetet i Oslo. 2007. *FRM4030 Forskningsforberedende kurs i farmakognosi og legemiddelkjemi*. Farmasøytisk institutt, avd for farmasøytisk kjemi, Universitetet i Oslo.

- Universitetet i Oslo, Kjemisk Institutt. (2007). "KJM5250 - Organic NMR spectroscopy laboratory experiments - part 2." 01.04.2008, <http://www.kjemi.uio.no/nmr/manuals/COSY.pdf>.
- Vardamides J.C., Sielinou V.T., Ndemangou B., Nkengfack A.E., Fomum Z.T., Poumale H.M.P. og Laatsch H. 2007. Diterpenoids from *Turraeanthus mannii*. *Planta Medica* **73**: 491-495.
- Wangensteen H., Alamgir M., Rajia S., Meza T.J., Samuelsen A.S. og Malterud K.E. 2007. Cytotoxicity and brine shrimp lethality of rotenoids and extracts from *Sarcolobus globosus*. *Natural Product Communications* **2**: 841-844.
- Weiner M.A. 1980. *Earth medicine-earth food*. Macmillan Publishing Co., Inc.: New York.
- Westhuyzen J. 1997. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. *Annals of clinical and laboratory science* **27**: 1-10.
- Weyerstahl P., Marshall H., Christiansen C., Kalemba D. og Gora J. 1993. Constituents of the essential oil of *Solidago canadensis* ("goldenrod") from Poland - a correction. *Planta Medica* **59**: 281-2.
- Wikipedia. (2007). "Kanadagullris." 01.04.2008, <http://no.wikipedia.org/wiki/Kanadagullris>.
- Wikipedia. (2007). "*Solidago canadensis*." 10.04.2008 [http://en.wikipedia.org/wiki/Solidago canadensis](http://en.wikipedia.org/wiki/Solidago_canadensis).
- Zhang J., Zhang X., Lei G., Li B., Chen J. og Zhou T. 2007. A new phenolic glycoside from the aerial parts of *Solidago canadensis*. *Fitoterapia* **78**: 69-71.
- Zdero C., Bohlmann F. og Niemeyer H.M. 1991. Seco-, nor-, normal and rearranged labdanes from *Haplopappus parvifolius*. *Phytochemistry* **30**: 3683-3691.